

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA VILLAR FONSECA

**O PAPEL DO IMUNOMARCADOR p16^(INK4A) NO MANEJO DA NEOPLASIA
INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU, SEU RISCO DE
RECORRÊNCIA E A ASSOCIAÇÃO COM A TIPAGEM DE HPV**

CURITIBA

2016

FERNANDA VILLAR FONSECA

**O PAPEL DO IMUNOMARCADOR p16^(INK4A) NO MANEJO DA NEOPLASIA
INTRAEPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU, SEU RISCO DE
RECORRÊNCIA E A ASSOCIAÇÃO COM A TIPAGEM DE HPV**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Medicina Interna,
do Curso de Pós-Graduação de Medicina Interna da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho
Co-orientador: Profa. Dra. Teresa C. Cavalcante

CURITIBA

2016

F676 Fonseca, Fernanda Villar

O papel do imunomarcador P16(INK 4A) no manejo de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau, seu risco de recorrência e a associação com tipagem de HPV / Fernanda Villar Fonseca. – Curitiba, 2016.

99 f.: il.; color; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sergio de Carvalho

Co-orientador: Prof^a. Dr^a Teresa C. Cavalcante

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna . Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Neoplasia intraepitelial cervical. 2. Conização. 3. Recidiva. I. Carvalho, Newton Sergio de. II. Cavalcante, Teresa C. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

NLMC: WZ 365




Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos doze dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezesseis, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dra. Maria da Graça Bicalho (PPG em Genética - UFPR), Dra. Lucia de Noronha (Depto. de Patologia PUC - Pr), Dr. Paulo César Giraldo (FCM-UNICAMP), Dr. Edison Luiz de Almeida Tizzot (Depto. Tocoginecologia - UFPR) e Dr. Newton Sérgio de Carvalho, orientador (Depto. Tocoginecologia - UFPR), exarou o presente parecer sobre a tese de doutorado elaborada por **FERNANDA VILLAR FONSECA**, aluna concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna – Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: **"O PAPEL DO IMUNOMARCADOR P16(INK4A) NO MANEJO DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU, SEU RISCO DE RECORRÊNCIA E A ASSOCIAÇÃO COM A TIPAGEM DE HPV"**. A Banca examinadora considerou que a aluna apresentou trabalho adequado para tese, e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutora em Medicina Interna**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Dra. Maria da Graça Bicalho 

Dra. Lucia de Noronha 

Dr. Paulo César Giraldo

Dr. Edison Luiz de Almeida Tizzot 

Dr. Newton Sérgio de Carvalho 

*AO MEU MARIDO E À MINHA FAMÍLIA, QUE
SEMPRE ME APOIARAM EM TODOS OS
MOMENTOS, AJUDANDO-ME A CHEGAR A ESTE
PONTO DO CAMINHO...*

*AO MEU FILHO, QUE ESPERO SEMPRE TENHA
MUITO ORGULHO DE SUA MÃE...*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr Newton, que ofereceu sempre sua perspicácia científica, amizade, perseverança e inestimável opinião crítica e construtiva para o sucesso deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dra Teresa, que com grande altruísmo e amizade, acolheu-me e muito contribuiu para o meu conhecimento e crescimento.

Ao meu marido, Luiz Claudio, que com paciência e amor socorreu-me em muitos dos momentos, quando tudo parecia ruir.

Ao meu amigo Carlos Afonso, meu maior incentivador neste projeto e no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos técnicos do laboratório de Patologia, pela inestimável colaboração no meu aprendizado.

À Gorete, do Departamento de Genética da UFPR, que com sua amizade e conhecimento técnico colaborou de forma cuidadosa e significativa a este projeto.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da elaboração deste trabalho, contribuindo para sua conclusão.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que
deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

RESUMO

Introdução: Avaliar a expressão do biomarcador p^{16INK4a} no produto de conização de mulheres com diagnóstico de NIC-AG e correlacionar a sua expressão com a severidade das lesões, a habilidade de prever a recorrência, as diferenças biológicas entre NIC 2 e 3 e a tipagem de HPV. **Método:** um estudo transversal, conduzido em pacientes que foram submetidas a conização por NIC-AG, com DNA-HPV previamente conhecido, entre janeiro 2009 e agosto 2011, no Hospital Erasto Gaertner/ Brasil. A pesquisa do p16 foi avaliada por meio da técnica de microarranjos teciduais e sua expressão correlacionada com o diagnóstico clínico, índice de recorrência e as diferenças biológicas entre NIC 2 e 3. O teste do X² foi usado para análise estatística com valor de $p \leq 0.05$, e a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia dos testes calculadas. **Resultados:** 192 mulheres, entre 22 e 48 anos (35 ± 6), divididas em 2 grupos: 102 NIC 2 e 90 NIC 3. A média de idade, paridade, hábito de fumar e técnica de conização foi semelhantes nos 2 grupos. O p16 foi positivo em 86% dos NIC 2 e 92% dos NIC 3. Em relação a recorrência o p16 teve VPP de 11%, VPN de 95%, sensibilidade de 95%, especificidade de 11% e acurácia de 93%. A habilidade do p16 em predizer as diferenças entre NIC 2 e 3 resultou em VPP de 48% e VPN de 66%, sensibilidade de 92%, especificidade de 13% e acurácia de 89%. **Conclusão:** A expressão do p16 isoladamente não foi capaz de predizer a recorrência da NIC-AG tratada e nem de demonstrar as diferenças biológicas entre NIC 2 e 3, entretanto sua expressão se relaciona diretamente com a severidade da doença.

Palavras-chaves: Neoplasia intraepitelial cervical, recorrência, marcadores biológicos, NIC-AG.

ABSTRACT

Background: The aim of this study is to evaluate the expression of biomarker p16^{INK4a} on the product of conization in women diagnosed with HSIL, to correlate immunostaining with lesion severity, the ability to predict recurrence and the biological differences between CIN 2 and CIN 3. Methods: A cross-sectional study was conducted in patients who had undergone conization due to HSIL and detected HPV DNA, at Erasto Gaertner Cancer Center (EGCC) Hospital, in Brazil. The expression of p16^{INK4a} was evaluated using tissue microarray technique and overexpression was correlated to diagnosis and clinical evolution. A chi-square test was used for statistical analysis with p-value less than or equal to 0.05 and the sensitivity, specificity, PPV, NPV, and accuracy of the tests calculated. Results: The review included 192 women, between 22 and 48 years old (35 ± 6), divided into two groups: 102 CIN 2 and 90 CIN 3 cases. The epidemiological data were similar in the two groups. p16 was positive in 86% of the CIN 2 and 92% of CIN 3. To predict recurrence p16 has PPV of 11%, NPV of 95%, sensitivity of 95%, specificity of 11%, and accuracy 93%. Applied to distinguish between CIN 2 and 3 p16 has VPP of 48%, VPN of 66%, sensitivity of 92%, specificity of 13%, and accuracy 89%. Conclusion: Immunostaging of biomarker p16 alone cannot predict the rate of recurrence of HSIL or can it demonstrate the biological differences between CIN 2 and 3; however, overexpression does increase with the degree of lesion severity.

Key words: Cervical intraepithelial neoplasia, recurrence, biological biomarkers, HSIL

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VÍRUS HPV.....	22
FIGURA 2- PRODUTO DE CONIZAÇÃO (TÉCNICA DO CAF/LEEP), EM 2 PEÇAS (MARGEM ECTOCERVICAL E MARGEM ENDOCERVICAL), COM MARGENS VERDADEIRAS MARCADAS POR TINTA NANQUIM, E ALÇAS DE CAF.....	38
FIGURA 3- REPRESENTAÇÃO HISTOLÓGICA DE NIC 2 E 3 EM LÂMINAS CORADAS PELA TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA.....	38
FIGURA 4- DIAGRAMAÇÃO DAS LÂMINAS DE TMA PARA LEITURA DO p16.....	40
FIGURA 5- REPRESENTAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA QUALITATIVA PARA p16 EM PEÇAS DE CONIZAÇÃO DE COLO UTERINO COM NIC-AG.....	41
FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA QUANTITATIVA PARA p16 EM PEÇAS DE CONIZAÇÃO DO COLO UTERINO COM NIC-AG.....	42
FIGURA 7- DIAGRAMA CONSORT	44

LISTA DE TABELA

TABELA 1- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA AMOSTRA DE TMA.....	45
TABELA 2- ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO p16 ^{INK4A} COM TESTES CAPAZES DE PREDIZER AS DIFERENÇAS ENTRE NIC 2 E 3 E O RISCO DE RECORRÊNCIA DA NIC-AG TRATADA.....	46
TABELA 3- CORRELAÇÃO ENTRE O COMPROMETIMENTO DAS MARGENS DO PRODUTO HISTOLÓGICO DA CONIZAÇÃO COM AS TAXAS DE RECORRÊNCIA E O RISCO RELATIVO PARA RECORRÊNCIA.....	48
TABELA 4- RELAÇÃO DOS DADOS RELACIONADOS À RECORRÊNCIA DA NIC-AG TRATADA POR CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS (A- AMOSTRA GLOBAL, B- AMOSTRA MARGENS LIVRES, C- AMOSTRA TMA).....	49
TABELA 5- ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA p16 ^{INK4A} COM OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS À RECORRÊNCIA DA NIC-AG TRATADA POR CAF.....	50
TABELA 6- ESCORE DE RISCO PARA AVALIAR A PROBABILIDADE DE RECORRÊNCIA DA NIC-AG TRATADA POR CONIZAÇÃO.....	50

ABREVIATURAS

CAF	- Cirurgia de Alta Frequência
CO	- Colpocitologia oncológica
DAB	- Diaminobenzidina
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DST	- Doença de Transmissão Sexual
EZT	- Excisão da Zona de Transformação
HE	- Haematoxilina-eosina
HEG	- Hospital Erasto Gaertner
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	- Human Papillomavirus
HSIL	- High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion
IARC	- International Agency for Research on Cancer
IVA	- Inspeção visual com ácido acético
LCR	- Long coding region
LEETZ	- Loop Electrosurgical Excision of Transformation Zone
NIC	- Neoplasia Intraepithelial Cervical
NIC-AG	- Neoplasia Intraepithelial Cervical de Alto Grau
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OR	- ODDS ratio
ORF	- Open Reading Frames
p16	- Proteína supressora tumoral p16
PBS	- Phosphate buffered saline
PCR	- Polymerase Chain reaction
RR	- Risco relativo
SIDA	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 A NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL	17
3.2 A HISTÓRIA NATURAL DA NIC.....	18
3.3 A INFECÇÃO PELO HPV NA CARCINOGENESE CERVICAL.....	19
3.4 A FISIOPATOLOGIA DA INFECÇÃO POR HPV NA CARCINOGENESE DO COLO UTERINO.....	21
3.5 O TRATAMENTO DA NEOPLASIA INTRAPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU.....	24
3.6 O RASTREAMENTO DA LESÃO PRECURSORA DO CÂNCER CERVICAL.....	25
3.6.1 A colpocitologia oncótica no rastreamento do câncer de colo uterino.....	26
3.6.2 O rastreamento e os Biomarcadores.....	27
3.7 A PROTEÍNA SUPRESSORA TUMORAL p16 ^{INK4A}	28
3.7.1 A proteína p16INK4a na carcinogênese cervical.....	29
3.8 O RISCO DE PERSISTÊNCIA, RECORRÊNCIA E/OU PROGRESSÃO DA NIC-AG.....	31
3.8.1 A Utilidade da p16 na predição do risco de recorrência e/ou progressão da NIC-AG.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	35
4.1 A SELEÇÃO DE PACIENTES, COLETA DE DADOS E AMOSTRA.....	35
4.1.1 A seleção de pacientes.....	35
4.1.2 A coleta de dados.....	36
4.2 A GENOTIPAGEM PARA HPV.....	37
4.3 A TÉCNICA DE CONIZAÇÃO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA PEÇA.....	37
4.3.1 A técnica de conização.....	37
4.3.2 Análise histopatológica.....	38
4.4 A REALIZAÇÃO DOS MICROARRANJOS TECIDUAIS E APLICAÇÃO E LEITURA DO IMUNOMARCADOR.....	39

4.4.1 Confecção do TMA e técnica de aplicação do imunomarcador.....	39
4.4.2 Leitura do imunomarcador.....	40
4.5 FATORES DE RISCO ANALISADOS PARA RECORRÊNCIA.....	43
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5 RESULTADOS.....	45
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	57
ANEXO 1- FICHA DE COLETA DE DADOS.....	65
ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO CEP.....	66
ANEXO 3 – PUBLICAÇÕES.....	66
3.1 ARTIGO PUBLICADO.....	66
3.2 ARTIGOS SUBMETIDOS.....	67
3.2.1 The role of HIV positive status as na independente fator for predicting the risk of recurrence of cervical HSIL.....	67
3.2.2 Prognostic factors related to recurrence after conization due to High Grade cervical intraepithelial neoplasia.....	76
3.2.3 The role of p16 and risk factors, in the management of High-grade Cervical intraepithelial Neoplasia (HSIL), to improve the diagnosis and predict the differences in biological evolution.....	88

1 INTRODUÇÃO

Com cerca de meio milhão de novos casos e 270 mil mortes ao ano no mundo, o câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pela terceira grande causa dos óbitos femininos. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos comparado com os mais desenvolvidos e as suas altas taxas de mortalidade poderiam ser reduzidas através de efetivos programas de rastreamento de suas lesões precursoras¹.

O câncer do colo uterino, embora passível de prevenção, apresenta-se como problema de saúde pública no Brasil. Ocupa hoje, o terceiro lugar em incidência dentre os cânceres da mulher, suplantado apenas pelo câncer de pele e de mama. Nas regiões menos favorecidas, como a região Norte do país, o câncer do colo do útero lidera as estatísticas de incidência e mortalidade².

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer cervical é uma importante área de atuação para qualquer programa de prevenção do câncer, por causa das altas taxas de morbidade e mortalidade e por seu potencial de prevenção através de programas de rastreamento. Sabe-se que 80% das mortes por câncer do colo uterino no mundo ocorrerão em países menos desenvolvidos, e que o Brasil tem cerca de 69 milhões de mulheres com idade igual ou superior a 15 anos, com risco de desenvolver câncer². Grande avanço, no sentido de prevenir o desenvolvimento do câncer cervical, consistiu na descoberta de suas lesões precursoras, isto é, as neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau (NIC-AG)³.

A neoplasia intraepitelial cervical é uma afecção relativamente comum, e se caracteriza como uma ampla gama de atipias celulares limitadas ao epitélio de revestimento do colo uterino, com potencial evolutivo e com uma longa história natural para progressão para o carcinoma invasor⁴.

Consideradas as verdadeiras lesões pré- cancerosas de colo uterino, a NIC 2 e a NIC 3 foram rotuladas pelo Sistema Bethesda em uma legenda única, as neoplasias intraepiteliais de alto grau (NIC-AG). Entretanto, apresentam-se de forma distinta em alguns aspectos morfológicos e comportamentais. A vasta maioria das NIC 2 são transitórias e regridem espontaneamente num curto espaço de tempo, enquanto a NIC 3 apresenta uma chance muito maior de progressão para uma neoplasia invasora^{5,6}.

Contudo, o manejo inadequado das neoplasias intraepiteliais aumenta o risco do câncer cervical no futuro e, por outro lado, de complicações relativas ao sobretratamento das mesmas^{5,7}.

Este câncer é quase exclusivamente (99.7%) associado à infecção persistente por tipos de Papilomavirus Humano (HPV) considerados de alto potencial oncogênico, principalmente os tipos 16 e 18⁸.

A efetividade do rastreamento do câncer cervical e de suas lesões precursoras é demonstrada através da redução das taxas de incidência e de mortalidade da doença em países desenvolvidos. A incidência pode ser reduzida em até 80% se a qualidade e a cobertura do rastreamento forem adequadas e o tratamento das lesões precursoras, efetivo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, um programa de prevenção e diagnóstico precoce do câncer de colo uterino bem estruturado, que alcance uma cobertura de 85% da população na faixa etária de risco, seria capaz de reduzir a mortalidade pela doença em 90%^{6,9,10}.

Apesar dos resultados promissores dos programas de prevenção, e o exame de citologia oncológica por Papanicolaou ser altamente custo-efetivo no diagnóstico precoce e na prevenção do câncer invasivo do colo do útero, as taxas de mortalidade e incidência mantêm-se entre as mais elevadas dentre os tumores malignos que ocorrem nas mulheres brasileiras. Isso se deve principalmente pela baixa cobertura populacional, não atingindo de forma efetiva a população de maior risco, além das limitações inerentes ao teste em si, incluindo-se sua sensibilidade moderada a baixa e sua capacidade de predição de risco futuro⁹.

Destacam-se, neste contexto, os esforços para a introdução de novas metodologias de rastreamento, sobretudo em países com poucos recursos financeiros. É incessante e intensa a busca atual por marcadores tumorais capazes de, especificamente, atribuir riscos diferenciados aos tumores associados ao HPV⁹. Pesquisas atuais estão focadas no desenvolvimento de objetivos biomarcadores que possam distinguir infecção transformante por HPV e prever a severidade da doença⁹.

O progresso no entendimento da carcinogênese cervical relacionada à infecção pelo vírus do HPV tem promovido a avaliação de vários biomarcadores que potencialmente poderiam melhorar o rastreamento e manejo das lesões precursoras deste câncer. O desenvolvimento de tecnologias que detectem e quantifiquem os transcritores dos oncogenes virais E6 e E7 têm sido considerados para a avaliação precisa da atividade oncogênica viral associada à progressão tumoral. Um dos principais exemplos é a

expressão da proteína inibitória da quinases dependentes da ciclina p16^{INK4a} promovida pela presença de E7^{10,11}.

Diversos estudos utilizam o aumento da expressão da proteína p16 para identificar células displásicas tanto em amostras citológicas quanto histológicas. A p16 é um biomarcador das infecções transformantes por HPV e pode ser utilizado em conjunto com a citologia e a histologia, permitindo a identificação de mulheres com resultados ambíguos que necessitem melhor avaliação. Há algumas evidências de que a expressão do p16 detectada por imunohistoquímica em espécimes histológicas possa ser um preditor de progressão da lesão cervical, mas não há ainda nenhum consenso a respeito de qual valor atribuir a espécimes p16 positivos, embora ele pareça ser um biomarcador promissor¹¹.

O presente estudo objetiva avaliar a expressão do p16^{INK4a} em pacientes diagnosticadas com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau, associando sua expressão com a habilidade de predizer a severidade da doença, o risco de recorrência e as diferenças biológicas entre NIC 2 e 3, além da sua relação com o tipo de HPV. Com estes resultados almeja inserir no mundo científico conhecimentos para oferecer uma intervenção segura e melhores estratégias de prevenção para um tumor tão comum em mulheres jovens e com alta prevalência no Brasil e no mundo.

2 OBJETIVO

Avaliar a aplicabilidade clínica do biomarcador p16^{INK4a}, por imunohistoquímica, em peças histológicas de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau, como preditor de gravidade, correlacionando o grau de sua reação imunohistoquímica com a severidade da lesão no colo uterino (NIC2 e NIC3), o risco de recorrência da lesão tratada e as diferenças biológicas entre NIC 2 e NIC 3 e sua relação com o tipo de HPV presente nestas pacientes.

Objetivos específicos:

1. Auxiliar nas discordâncias diagnósticas, avaliando a intensidade do p16 nas diferentes gradações da neoplasia intraepitelial cervical de alto grau, sobretudo no intuito de demonstrar as diferenças biológicas entre NIC 2 e 3;
2. caracterizar a NIC 2 através do p16, avaliando a possibilidade de seu uso rotineiro como “seguimento” do NIC 2;
3. definir risco de recorrência pela positividade da p16 em pacientes com margem comprometida do produto de conização;
4. avaliar a capacidade do p16 de estabelecer o risco de recorrência da NIC-AG tratada e sua relação com outros fatores clínicos preditores de recorrência.

3 REVISÃO LITERATURA

3.1 A NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

As lesões precursoras do câncer de colo de útero foram primeiramente descritas por Cullen em 1900 e Rubin em 1910, como achados histopatológicos casuais em bordas de tumores francamente invasores. As células observadas nessas lesões tinham aspectos morfológicos semelhantes às do tumor infiltrante, porém estavam contidas dentro do epitélio transformado. A melhor caracterização dessas lesões iniciais deveu-se a dois inovadores procedimentos propedêuticos: a colposcopia, idealizada por Hinselmann, em 1925, e a colpocitologia oncótica (CO), preconizada em 1938, por Papanicolaou¹³.

Em 1967, Richardt reconheceu que tais lesões possuíam caráter neoplásico verdadeiro. Preferiu nomeá-las como neoplasia intraepitelial cervical, graduando-as como NIC 1, NIC 2 e NIC 3, de acordo com a intensidade das atipias. Em decorrência das dificuldades na precisão dos diagnósticos diferenciais entre NIC 3 e carcinoma *in situ*, em 1973, Richardt propôs, como legenda diagnóstica única, o encontro de NIC 3 e carcinoma *in situ*¹³.

As neoplasias intraepiteliais cervicais são lesões proliferativas, com maturação anormal e atipias de graus variáveis substituindo parte ou toda espessura do epitélio escamoso cervical. São frequentemente assintomáticas e seu diagnóstico e tratamento adequados estão intimamente relacionados à prevenção da neoplasia invasora do colo uterino¹⁴.

A graduação das lesões precursoras em NIC 1, NIC 2 e NIC 3 é embasada na intensidade dos distúrbios morfológicos celulares, relacionados, principalmente, com a proliferação, a atipia celular e as mitoses. Esses critérios morfológicos são avaliados também em relação ao nível que alcançam na verticalidade do epitélio. Utiliza-se, universalmente, o sistema de divisão do epitélio em três terços: inferior, mediano e superficial. Desse modo, na NIC 1 as alterações celulares e a perda de diferenciação ficam restritas ao terço inferior do epitélio; na NIC 2 ocorrem nos dois terços inferiores e na NIC 3 existem alterações morfológicas que ocupam os três terços do epitélio¹³.

No carcinoma *in situ* existe inquestionável envolvimento de toda a espessura do epitélio, sem qualquer evidência de diferenciação celular, estando a membrana basal íntegra¹³.

Ostor concluiu, em 1993, que muitos tipos de carcinomas escamosos da cérvix uterina eram provenientes de precursores intraepiteliais e que as evidências desse fato eram embasadas nos seguintes quesitos: a NIC geralmente ocorria uma década antes do câncer invasivo (o que suporta o conceito de evolução temporal desse tipo de câncer); mulheres com anormalidades intraepiteliais desenvolviam câncer muito mais frequentemente do que as que não as tinham; os carcinomas em estádios precoces aconteciam na periferia da NIC ou na cripta das glândulas e os francamente invasores eram frequentemente rodeados por uma lesão *in situ*; existiam evidências laboratoriais da semelhança entre NIC e carcinoma invasor do colo uterino e estudos epidemiológicos já evidenciavam muita semelhança nos fatores causais de ambos⁵.

3.2 A HISTÓRIA NATURAL DA NIC

No passado acreditava-se que as lesões cervicais de alto grau decorriam da progressão de NIC 1 para NIC 2 e subsequentemente para NIC 3. Estas lesões se comportariam como um *continuum* progressivo, levando ao câncer cervical. Todavia, estudos mais recentes têm evidenciado o surgimento de NIC 3 sem detecção prévia de lesões de baixo grau, demonstrando que parece haver uma diferença de comportamento biológico entre a NIC 1, a NIC 2 e a NIC 3^{5,9,15}.

As lesões precursoras do câncer cervical têm, em geral, um curso evolutivo desigual e lento; podendo progredir, permanecer inalteradas ou sofrer regressão⁵. Para alguns autores, NIC 1, NIC 2 e NIC 3 representam processos distintos, no qual a NIC 1 é autolimitada e espelha a infecção pelo papilomavírus sexualmente transmitido, enquanto que a NIC 2 e a NIC 3 seriam as verdadeiras lesões pré-malignas^{5,13}.

Quando estratificadas pelo grau de severidade, observa-se que a NIC 1 tem chance de 60% de regressão, 30% de persistência, 10% de progressão para NIC 3 e 1% de risco de evolução para invasão; a NIC 2 tem 40% de chance de regressão, 40% de persistência, 20% de progressão para NIC 3 e 5% de evolução para invasão. Enquanto isto a NIC 3 tem 33% de chance de regressão e mais de 12% de risco de evolução para uma neoplasia invasora⁵.

A NIC origina-se em células metaplásicas imaturas, que mais provavelmente se alteram devido a uma associação de fatores, como agentes oncogênicos, distúrbios imunológicos e outros, encontrados principalmente em certos grupos epidemiológicos¹³.

Pesquisas revelam que o grupo de risco para essa neoplasia é composto de mulheres jovens, e que fatores como infecção persistente por HPV de alto risco, imaturidade imunológica, presença de ectrócios cervicais, uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e multiplicidade de parceiros sexuais, dentre outros, facilitam a instalação desta neoplasia^{5,13,16}.

3.3 A INFECÇÃO POR HPV NA CARCINOGENESE CERVICAL

Estudos epidemiológicos e moleculares desenvolvidos nos últimos 30 anos levaram ao reconhecimento de certos tipos do *Human Papillomavirus* (HPV) como agente etiológico do câncer cervical. Cerca de metade dos tipos de HPV conhecidos, incluindo suas variantes, têm sido isolados nas mucosas genitais. A associação de alguns tipos de HPV primariamente com tecidos normais e lesões benignas, assim como de tipos associados ao câncer, levaram ao conceito de HPV de baixo e alto risco oncogênico, respectivamente⁹.

Classificados entre os mais potentes carcinógenos em humanos, os HPV de alto risco oncogênico são considerados, atualmente, os responsáveis por, pelo menos, 5% de todos os cânceres no mundo (câncer de colo uterino, genitália externa, ânus, pênis e orofaringe), proporção esta que chega a 15% dos cânceres em mulheres que vivem em países em desenvolvimento, afetando também proporções consideráveis dos homens^{6,9,17,18}.

Muñoz e Bosch, em sua metanálise, concluíram sobre as fortes evidências da associação entre a presença do HPV e o câncer do colo uterino. Segundo eles, vários estudos epidemiológicos usando métodos de hibridização para o DNA-HPV, evidenciaram a relação causal do HPV com a doença cervical. Concluíram também sobre a relação dose-resposta do aumento da carga viral com o risco desse câncer e sobre as evidências indiretas que sugeriam a detecção do DNA-HPV em células cancerígenas como um bom marcador da infecção por HPV, acontecendo antes do desenvolvimento da neoplasia invasora¹⁹.

Combinando os dados de seu estudo com estudos prévios, Walboomers *et al.* concluíram que a prevalência mundial do HPV no carcinoma do colo uterino é de 99,7% e sua presença em virtualmente todos os cânceres do colo uterino implica numa das maiores prevalências de um fator causal atribuído a qualquer câncer humano⁸.

Os HPV de alto risco oncogênico expressam proteínas oncogênicas que interferem com as funções do crescimento celular. Como consequência da contínua expressão do

genoma viral na célula, a instabilidade cromossômica pode acontecer, levando à completa transformação celular⁹.

Estudos indicam que a persistência do HPV de alto risco oncogênico pode determinar a progressão para estágios mais severos da doença cervical, enquanto que a maioria das infecções por HPV é transitória e não parece ser importante na carcinogênese cervical. O risco para a progressão da doença parece estar associado ao ciclo do HPV no hospedeiro^{6,8,9,15,19}. A história natural do HPV no hospedeiro humano apresenta alguns pontos ainda não totalmente elucidados. A infecção por HPV é muito comum entre mulheres jovens, e durante a vida sexual, cerca de 70% das mulheres terão contato e/ou infecção transitória pelo mesmo. Apesar desses altos índices de infecção, poucas mulheres infectadas terão câncer cervical¹⁵.

Segundo consenso da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 5 a 15% de mulheres negativas para HPV são infectadas, a cada ano, com algum tipo de HPV de alto risco oncogênico. A incidência dos tipos de alto risco oncogênico tende a ser maior que os de baixo risco. Os subtipos mais frequentes são os 16, 18, 31, 33 e 51; entretanto, um dos tipos mais frequentes entre os estudos é o HPV 16⁶.

Os índices de infecção por HPV de alto risco tendem a ser maiores entre mulheres jovens do que entre as de mais idade. Alguns estudos avaliados pela OMS sugerem que a persistência da infecção pelo HPV aumente com a idade⁶.

A persistência da infecção por HPV tem implicações para a patogênese da lesão precursora e do câncer invasor¹⁵. Contudo, mais dados são necessários para esclarecer porque as infecções por diferentes tipos de HPV agem independentemente na cérvix uterina, modificando a resposta imunológica de forma desigual⁸. Em média, 10% das lesões relacionadas ao HPV no colo uterino progridem para carcinoma *in situ* e 1% para carcinoma invasor⁶.

A média de idade para o diagnóstico de mulheres com lesões precursoras do câncer, na maioria dos países que adotam programas de rastreamento, é de aproximadamente 30 anos. E a idade nas quais se detecta câncer invasivo, é cerca de 10 anos mais tarde, o que sugere um longo tempo para a progressão da lesão pré-cancerosa⁶.

A história natural do câncer cervical, tipicamente, estende-se por um período de 15 a 20 anos e envolve um número de passos críticos, incluindo infecção por HPV, persistência da infecção, progressão para lesão precursora e finalmente desenvolvimento do câncer invasor. Em indivíduos imunocompetentes, o desenvolvimento de infecção por

HPV e de neoplasias intraepiteliais de baixo grau são frequentemente reversíveis e o *clearance* do HPV e a regressão das lesões precursoras frequentemente ocorre⁴.

A ativação da resposta imune do hospedeiro parece ser o ponto determinante entre a resolução da infecção pelo HPV ou a progressão para a doença da cérvix ou do trato anogenital. Enquanto a natureza exata da resposta imune permanece incerta, há evidências da colaboração das células T *helper*, células T citotóxicas e de mecanismos da resposta imune inata. Entretanto, o HPV é capaz de driblar várias funções no mecanismo da resposta imunológica do hospedeiro, transformando-a numa resposta lenta e fraca⁴.

3.4 A FISIOPATOLOGIA DA INFECÇÃO POR HPV NA CARCINOGENESE DO COLO UTERINO

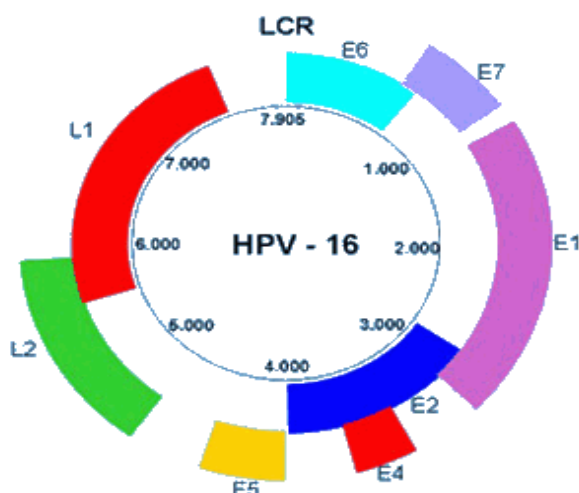
Os vírus podem contribuir para o desenvolvimento de tumores em seres humanos por diferentes mecanismos: indiretamente, por indução de imunossupressão ou induzindo modificações no genoma da célula hospedeira, sem a persistência do DNA viral; diretamente, pela indução de oncoproteínas ou pela alteração da expressão das proteínas da célula hospedeira devida à integração do DNA viral¹⁷.

A patogênese molecular do câncer causado por HPV de alto risco oncogênico ainda não é totalmente compreendida. Algumas características, entretanto, já são bem evidentes. Esses vírus são auto-suficientes para induzir carcinogênese, apesar da infecção *per se* não ser suficiente para induzir malignidade. A indução de instabilidade cromossômica, de mutações e de aneuploidia em células previamente não proliferativas da camada basal e suprabasal do epitélio do colo uterino emerge das modificações em genes que controlam a transcrição viral e as funções das oncoproteínas virais^{17,18}.

O HPV é um vírus de formato icosaédrico, pertencente à família *Papovaviridae*. O seu genoma está dividido em regiões denominadas *Open Reading Frames (ORF)*, as quais se localizam em uma mesma fita de DNA e constituem os genes virais. Os três fragmentos subgenômicos na organização do genoma do HPV, até agora identificados, são: região precoce ou E de *early*, região tardia ou L de *late* e região não codificada ou LCR de *long coding region* (figura 1)^{9,13}.

Entre os genes indutores de atipia celular, situados na região precoce, destacam-se o E1 e o E2, relacionados com a replicação episomal e a regulação da transcrição; o E6 e o E7, que inativam o gene produtor das proteínas p53 e pRb, supressoras do crescimento tumoral. Já os genes L1 e L2 estão relacionados à formação do capsídeo viral^{9,13}.

Figura 1 – Representação esquemática do vírus do HPV



Fonte: www.ipoportor.min-saude.pt

O gene p53, localizado no cromossomo 17, expressa a proteína p53 que tem a importante função de ativar genes que mantêm a estabilidade do genoma. Na divisão normal da célula a p53 não é necessária, porém quando o DNA é, de alguma forma lesado, a sua função reparadora é induzida, o que lhe confere o título de “guardião do genoma”¹⁶. Havendo modificação do DNA, a expressão da p53 é aumentada, ativando a proteína p21, que bloqueia o ciclo celular em G1, para a reparação do DNA. Quando essa reparação não ocorre, a p53 induz a apoptose¹³.

O gene Rb, localizado no cromossomo 13, expressa a proteína pRB, que se une ao fator de transcrição E2F na fase G1 do ciclo celular. Durante o ciclo celular normal, a pRb é fosforilada, liberando E2F. Se a E2F permanecer ativada, por interferência na habilidade da pRb de manter a E2F inativa, faz com que haja um crescimento desordenado das células¹³.

O genoma do HPV é mantido em sua forma episomal nas células infectadas, porém, para a progressão da infecção para neoplasia intraepitelial ou câncer, é preciso a integração ao DNA da célula hospedeira e isso envolve os genes E1 e E2 do vírus, que regulam a expressão viral na célula. Quando o gene E2 é desmembrado, como resultado da integração do genoma viral, altos níveis dos genes E6 e E7 viral são observados. O E1 é responsável pela replicação do genoma viral no hospedeiro^{9,17,18}.

Proteínas específicas celulares ligam-se às oncoproteínas E6 e E7 do HPV de alto risco. A oncoproteína E7 se une ao gene de susceptibilidade do retinoblastoma (pRb), enquanto que a E6 se une à p53, que é um gene de supressão tumoral^{7,17,18}. Esta união promove a degradação da p53, removendo o controle do ciclo celular dependente da p53 e

consequentemente, impedindo a reparação do DNA. Em decorrência disso, surgem os genes mutantes, que são perpetuados, levando à proliferação desordenada, que é uma característica das lesões neoplásicas^{9,13,17,18}.

A E7, associada à transcrição de produtos da pRb, promove liberdade para a transcrição de muitos genes envolvidos na progressão de células no ciclo celular. A E7 parece demonstrar interação com ciclina-A e cinase-2 ciclina dependente, ambas atrapalhando a progressão do ciclo celular. A E7 liga-se à pRb, interferindo na sua capacidade de manter a E2F na forma inativa, levando ao crescimento desordenado das células. Atribui-se ainda ao gene E7 a capacidade de reduzir a expressão dos antígenos de histocompatibilidade, situados em superfície celular, o que pode explicar, pelo menos em parte, o retardo da resposta imunológica do hospedeiro^{9,13,17,18}.

Interferências com a função da pRb e da p53 podem determinar a perda do controle do ciclo celular e promover instabilidade cromossômica e aneuploidia. Porém, os genes E6 e E7 em infecções por HPV de baixo risco parecem expressar essas oncoproteínas de forma menos efetiva e, por consequência, falham nas modificações cromossômicas. Contudo, a integração dos genes E6 e E7 do HPV de alto risco com as proteínas celulares pRb e p53 representam um fator de progressão endógena, tornando-se importante na progressão das lesões pré-malignas e malignas^{9,13,17}. Somando-se a essas modificações endógenas do DNA da célula hospedeira, há a contribuição de fatores mutagênicos exógenos, que provavelmente determina o desenvolvimento do câncer⁶.

Cofatores podem ser considerados, além do HPV, na patogênese das anormalidades do colo uterino. Entre eles, destacam-se principalmente fatores genéticos, alimentares, ambientais, o uso de contraceptivos hormonais, o tabagismo e o estado imunológico. Esses cofatores interagem, em maior ou menor intensidade, de maneira a aumentar a susceptibilidade do hospedeiro ao HPV, favorecendo sua infecção, sua multiplicação e a persistência da sua atuação, oferecendo grande oportunidade para a integração do genoma viral ao genoma celular, com concomitante expressão das proteínas virais e perda do controle celular^{6,16}. Quando modificações pré-cancerosas são encontradas no tecido cervical, identificadas precocemente e tratadas, o câncer de colo uterino não se desenvolverá²⁰.

Existe grande interesse na atualidade em se pesquisar aspectos relacionados à etiopatogenia do câncer cervical e suas lesões precursoras, no sentido de se estabelecer sua prevenção primária. As investigações têm se voltado para estratégias que levem em conta o

papel representado pelo agente causal, que é o papilomavírus humano, bem como para cofatores que favoreçam a ação do mesmo⁶.

3.5 O TRATAMENTO DA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU

O adequado tratamento da NIC é um importante componente dos programas de prevenção do câncer cervical. O manejo inadequado de uma NIC-AG pode aumentar o risco de progressão para neoplasia invasora futura por um lado, e, ao mesmo tempo, aumentar o risco de complicações relativas ao futuro reprodutivo da mulher por sobretratamento⁷.

Até a década de 60, métodos agressivos, como conização e histerectomia, eram utilizados para o tratamento das neoplasias intraepiteliais cervicais em todos os graus. A introdução de uma abordagem ambulatorial, mais conservadora, como destruição ou excisão da zona de transformação anormal, representou importante avanço para as mulheres com doença cervical pré-maligna¹⁴.

A exérese em alça larga da zona de transformação, a LEETZ (Large Loop Excision of Transformation Zone), desenvolvida por Cartier, em 1981, e aperfeiçoada por Prendiville, em 1987, é um procedimento que retira toda a zona de transformação com vistas ao tratamento das lesões precursoras do câncer do colo uterino. É também conhecida como loop excision, loop electrosurgical procedure, dentre outros, e no Brasil, como cirurgia de alta frequência (CAF) ou exérese da zona de transformação (EZT)^{12,21}.

A EZT apresenta vantagens em relação à conização a frio por ser um procedimento ambulatorial, realizado com anestesia local, com baixo risco de complicações, de fácil execução e aprendizado. Inicialmente a técnica consistia apenas no uso de uma alça para retirada da zona de transformação, mas com o passar do tempo o uso da segunda alça foi introduzido para conseguir abranger as lesões mais profundas, no entanto, aumentando os riscos em relação ao futuro reprodutivo da mulher tratada²¹.

Atualmente, tanto métodos ablativos quanto excisionais são utilizados no tratamento da neoplasia intraepitelial cervical. Tratamento ablativos (que destroem o tecido afetado) incluem a crioterapia, a ablação a laser e a eletrofulguração. Já os métodos excisionais (que removem o tecido afetado) incluem a conização a bisturi a frio, a LEETZ, a conização a laser e a conização por agulha eletrocirúrgica⁷.

A decisão sobre que método terapêutico usar depende de considerações a respeito da idade e paridade da paciente, desejo gestacional futuro, histórico de tratamentos prévios,

avaliação de risco para futuro seguimento, experiência médica e a adequada visualização da zona de transformação. Contudo, os tratamentos excisionais têm sido preferenciais, uma vez que fornecem tecido para análise histológica e, subsequentemente, descartam a lesão invasora⁷.

Tem sido reconhecido que a conização a bisturi a frio aumenta o risco de trabalho de parto prematuro, recém-natos de baixo peso e aumento dos índices de cesariana. A CAF e a conização a laser também parecem aumentar o risco de trabalho de parto prematuro, recém-natos de baixo peso e amniorrexis prematura, porém em menor escala⁷.

Adolescentes e mulheres jovens são consideradas uma população especial. Embora as neoplasias intraepiteliais pareçam ser muito comuns nesta fase, o risco de carcinoma invasor é muito baixo e as taxas de regressão espontânea são maiores^{7,15,22}.

Baseados nestes dados, a Sociedade Americana de Colposcopia em 2006 e as Diretrizes Brasileiras Atuais, preconizam que jovens menores de 20 anos, portadoras de NIC 2 e colposcopia satisfatória possam ser tratadas de forma conservadora, ou seja, observacional. Entretanto, se a colposcopia for insatisfatória ou se a lesão persistir por mais de 1 ano, então que se proceda ao tratamento. Já a NIC 3 deve ser sempre submetida a conduta ativa e não observacional, preferentemente usando-se métodos excisionais, e nunca a histerectomia como terapia primária^{2,7}.

A falha de tratamento de uma NIC, tratada por método ablativo ou excisional, ocorre entre 1 a 25% dos casos. Considera-se aceitável no tratamento de uma NIC 2/3 recorrente, um segundo tratamento excisional ou a histerectomia. A maioria das recorrências se manifestará dentro dos 2 primeiros anos após o tratamento e isto aumenta o risco de desenvolvimento de neoplasia invasora⁷.

3.6 O RASTREAMENTO DA LESÃO PRECURSORA DO CÂNCER CERVICAL

Embora não seja a realidade para a maioria das neoplasias que ocorrem em humanos, a incidência e a mortalidade por câncer do colo do útero podem ser controladas pelo rastreamento. O que particulariza este câncer em relação às demais neoplasias é o fato de que esse tipo se desenvolve a partir de lesões pré-invasivas bem definidas, de comportamento conhecido, e de evolução lenta, as chamadas “neoplasias intraepiteliais cervicais”²³.

As NIC's, além da história natural lenta, ocorrem em região anatômica de fácil acesso, favorecendo o diagnóstico. Os avanços médicos ocorridos a partir da última metade

do século XX permitiram, com mutilações mínimas e de pequena repercussão clínica, tratar as NIC's com probabilidade de cura de 90%²³.

Nos locais onde ocorre com sucesso, o rastreamento para o câncer da cérvix uterina é realizado com o uso da colpocitologia oncótica (CO). Algumas regiões e países obtiveram reduções de até 70% da incidência de câncer do colo uterino, com equivalente redução da mortalidade²¹. Contudo, os benefícios do rastreamento por meio da colpocitologia oncótica não foram obtidos de forma homogênea em todo o mundo. Ainda hoje, a cada ano, meio milhão de mulheres são vítimas do câncer do colo uterino e metade delas morre pela doença. Entretanto, o rastreamento por meio da CO só foi efetivamente introduzido em regiões bem respaldadas economicamente, fracassando, por outro lado, nos locais mais pobres. Não é por acaso que 78% dos novos casos desse tipo de câncer ocorrem no chamado “mundo em desenvolvimento”²¹.

3.6.1 A Colpocitologia Oncótica no Rastreamento do câncer de colo uterino

O exame de colpocitologia oncótica (Papanicolaou) ainda é o principal método utilizado para a detecção do câncer da cérvix e suas lesões precursoras. Essa técnica, descrita por George Papanicolaou, em 1941, consiste na avaliação morfológica das células de esfregaços obtidos da superfície do colo uterino¹⁰.

A colpocitologia oncótica é considerada um teste bastante específico para o diagnóstico de lesões pré-cancerosas e do câncer invasor, porém a depender da qualidade da coleta, da fixação e do condicionamento do material, além do adequado treinamento da equipe envolvida no processo, sua sensibilidade será apenas moderada²⁴.

Apesar do impacto da colpocitologia em programas de rastreamento do câncer do colo uterino, esse método possui muitas limitações: altas taxas de falso-negativos, a natureza subjetiva do teste, a necessidade de ser repetido em intervalos frequentes e a larga variação de sensibilidade e especificidade entre os laboratórios^{10,23,27}. Algumas causas podem explicar o erro no diagnóstico da neoplasia cervical e de lesões precursoras à colpocitologia, como a falta de critérios morfológicos seguros para microinvasão, a ausência de amostragem da junção escamo-colunar e a escassez de células neoplásicas nas amostras^{10,27}.

A sensibilidade da colpocitologia em detectar NIC 2 e 3 está em torno de 60% e sua especificidade em torno de 75%. A citologia de base líquida é provavelmente mais sensível, porém menos específica para detectar neoplasia cervical invasora²⁸.

Em programas de rastreamento, a sensibilidade e a especificidade são dois parâmetros importantes na escolha do exame. No caso da CO, embora a sensibilidade varie entre 18 e 76%, sua escolha como método de rastreamento em muito se deve à sua elevada especificidade. Mesmo que a sensibilidade da citologia seja relativamente baixa, a longa duração da fase pré-invasora permite que a doença, ainda que não diagnosticada em uma determinada rodada de rastreamento, seja detectada na seguinte; ou seja, a mera repetição do exame resultaria em melhora substancial da detecção de lesões precursoras, mas isso ressalta a necessidade de um programa organizado²³.

3.6.2 O Rastreamento e os Biomarcadores

Apesar da histologia nas biópsias cervicais ser considerada “padrão-ouro” na avaliação das neoplasias intraepiteliais e carcinomas cervicais, é dependente da variabilidade intra-inter observador. Novos marcadores aplicados nos espécimes cirúrgicos poderiam melhorar a identificação de mulheres com resultados ambíguos que requeiram tratamento¹³.

A identificação e a utilização de ferramentas que possam complementar tanto o diagnóstico quanto o rastreamento das lesões precursoras do câncer do colo uterino é de suma importância. Uma vez que a grande maioria das lesões precursoras desse câncer regride espontaneamente, a identificação das lesões que realmente necessitem serem tratadas evitaria a utilização de métodos agressivos desnecessários. Enquanto lesões com maior chance de progredirem seriam passíveis de tratamento antes do desenvolvimento de um câncer invasivo¹⁰.

Os biomarcadores tumorais são indicadores de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico. A expressão desses marcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais. Um biomarcador tumoral ideal possui relação direta com o processo maligno, correlaciona-se com a massa tumoral, permite a caracterização do tipo de tumor, a localização, o estadiamento, bem como fornece uma avaliação prognóstica do tumor em questão¹⁰.

Diversos estudos visam a análise dos níveis de proteínas relacionados ao evento da integração do DNA-HPV/oncoproteínas virais ao ciclo celular do hospedeiro. As principais descritas na literatura são: p53, p16^{INK4a}, MCM2-7, EGFR, ciclina D, ciclina E, p21^{waf1} e p27^{kip1}, entre outras¹⁰.

Pesquisas estão focadas no desenvolvimento de novos biomarcadores que possam distinguir infecção transformante por HPV e prever a severidade da doença¹⁰. Para países em desenvolvimento, é necessária uma avaliação do papel das novas tecnologias para a prevenção do câncer do colo uterino que sejam úteis no contexto da saúde. Qualquer combinação de testes de rastreio aumenta a sensibilidade, mas diminui a especificidade e aumenta o custo. Apesar de promissores, não há ainda estudos suficientes mostrando qual é a melhor combinação^{10,27}.

3.7 A PROTEÍNA SUPRESSORA TUMORAL p16^{INK4a}

A proteína supressora tumoral celular p16^{INK4a} tem sido identificada como um marcador da transformação da infecção por HPV. Fisiologicamente, a p16 bloqueia a atividade das *Kinases* ciclo-dependentes CDK4/6. Em uma infecção HPV transformante, os oncogenes virais E6 e E7 interferem substancialmente com a apoptose e a regulação do ciclo celular. Mais importante, a ruptura da proteína Rb pelo E7 promove a progressão do ciclo celular, ativada pela CDK4/6²⁶. Células afetadas expressam fortemente a p16 para controlar a ativação do ciclo celular irregular. Com o tempo, a p16 acumula no núcleo e no citoplasma das células afetadas, podendo ser detectado por imunohistoquímica¹¹.

O ciclo da p53 e da pRb, em parte, é controlado pela CDKN2A (INK4a/ARF), em cujo *locus* estão codificadas duas proteínas supressoras tumorais: a p16^{INK4a} e a p14^{ARF}. A p16^{INK4a} é um elemento da via pRb e pode induzir o ciclo celular em G1 pela inibição da fosforilação de cinase-4 e 6 ciclina-dependente; e também, a p16^{INK4a} tem um importante papel na senescência celular²⁷.

A proteína p16 é uma cinase 4-ciclina dependente, que é expressa em um limitado número de tecidos normais e tumorais. A p16 está integralmente relacionada à mediação do controle da transição da fase G1-S do ciclo celular²⁸.

A expressão da p16 em tecidos humanos varia com a idade. Em crianças, sua expressão é essencialmente confinada ao timo, enquanto que em adultos há expressão no endométrio proliferativo, ductos mamários, células do antro gástrico, epitélio escamoso esofageano, glândulas salivares e algumas células neuroendócrinas²⁸.

A perda da função da p16 foi demonstrada em algumas neoplasias; de fato, a alta frequência de deleção da p16 em linhas tumorais sugere um importante papel na carcinogênese. Foi inicialmente sugerida a sua inativação em pacientes com melanoma familiar, e também em outros tipos de tumores sua forte expressão da p16 têm sido

documentada. Positividade difusa tem sido descrita em dermatofibrossarcomas protuberantes, adenocarcinomas gástricos, linfomas Hodgkin e não Hodgkin, vários tumores pulmonares neuroendócrinos e tumor de pequenas células²⁸.

3.7.1 A p16^{INK4a} na carcinogênese cervical

Nos últimos anos, a p16 tem sido exaustivamente investigada como um auxílio diagnóstico no cenário das doenças ginecológicas. Assim como vários outros marcadores, em cada um desses cenários a p16 não é 100% específica nem sensível. Entretanto, em muitas áreas já se confirma seu indubitável valor, frequentemente quando usada em combinação com outros marcadores²⁸.

Atualmente, a maior aplicação da p16 tem sido no campo das doenças ginecológicas. Positividade difusa (em oposição à positividade focal) com p16 em cérvix uterina pode ser identificada como um marcador da presença do vírus do papiloma humano (HPV), que quando utilizada em conjunto com a citologia oncótica ou a biópsia de colo uterino, permite a identificação de mulheres com resultados ambíguos, que necessitem avaliação complementar por colposcopia, e subsequente tratamento da lesão^{11,28}.

A imunohistoquímica por p16 pode ser facilmente aplicável tanto em espécimes de citologia quanto de histologia²⁶. A intensidade da reação por p16 relaciona-se com a severidade da neoplasia intraepitelial cervical tanto na citologia, quanto na histologia, entretanto há uma grande variabilidade da positividade em lesões dúbias e de baixo grau, demonstrando a dificuldade de reprodutibilidade dos resultados nessas categorias¹¹.

Quando utilizada no rastreamento de lesões em mulheres com resultados equivocados de citologia oncótica, a p16 aparentemente demonstra menor ou igual sensibilidade que a captura híbrida para HPV, porém maior especificidade quando comparada à captura¹¹.

Em lesões escamosas cervicais, a p16 é positiva na maioria das lesões intraepiteliais cervicais de alto grau, e em alguns casos de lesões de baixo grau, usualmente aquelas associadas à infecção por HPV de alto risco oncogênico²⁸. A positividade da p16 pode ser útil para identificar algumas lesões intraepiteliais focais de alto grau em colo uterino, distinguindo alguns casos de NIC focal em epitélio metaplásico imaturo de epitélio metaplásico imaturo sem atipias e para diferenciar de lesões benignas mimetizando NIC²⁸.

Há algumas evidências de que a positividade focal da p16 em espécimes histológicos relaciona-se com a predição da progressão da lesão, podendo identificar as

NIC 1 que teriam maior potencial de evolução, mas o número de estudos ainda é limitado para esta conclusão¹¹.

Acredita-se que as lesões de baixo grau (NIC 1) exibindo positividade do p16, tenham maior chance de progressão para uma lesão de alto grau que uma p16 negativa²⁸.

A maioria dos carcinomas escamosos cervicais, glandulares e de pequenas células é p16 positivo. Em lesões glandulares cervicais, a p16 é útil para diferenciar entre adenocarcinoma *in situ* (positividade difusa) e carcinoma endometrial tipo adenocarcinoma (positividade negativa ou focal)²⁸.

A avaliação imunohistoquímica por p16 também parece reduzir a variabilidade da interpretação inter-observador das biópsias de colo uterino, auxiliando especialmente no diagnóstico de pequenas áreas focais de lesão de alto grau^{28,29}. Também pode ser de grande auxílio na distinção entre áreas de atrofia mimetizando neoplasia intraepitelial de alto grau^{28,29}. Pode ainda reduzir os índices de falso-negativo e falso-positivo das interpretações das biópsias aumentando a acurácia da detecção das NIC 2 e 3 e das NIC 1 associada a maior risco de progressão por infecção transformante por HPV²⁹.

Algumas vezes a p16 pode ser útil na análise das margens do produto de conização, possibilitando a diferenciação de margens comprometidas por lesão em margens não avaliáveis devido a artefatos térmicos²⁸.

Poucos estudos correlacionaram a expressão do p16 com a evolução desfavorável da NIC pós conização. Nam *et al*³⁰, em seu estudo na Korea, demonstraram a utilidade da expressão do p16 como um biomarcador preditor de recorrência da NIC e do risco de progressão para carcinoma invasor e, segundo eles, a expressão do p16 pode ser utilizada clinicamente para estratificar as pacientes que requeiram tratamento mais agressivo.

A meta-análise produzida por Tsompou *et al*¹¹, concluiu que, apesar de haver boas evidências do p16^{INK4a} correlacionar-se com a severidade das anormalidades citológicas e biológicas, sua reprodutibilidade é limitada devido à padronização insuficiente da interpretação da imunohistoquímica, entretanto, um consenso precisa ser procurado para a validação do p16 e sua aplicabilidade clínica em questões específicas.

Recente consenso sobre o assunto foi divulgado pela Sociedade Europeia de Colposcopia, e determinou que marcadores biológicos podem ser usados em conjunto com a Haematoxilina-eosina (HE) para o aprimoramento do diagnóstico das neoplasias intraepiteliais, sendo o p16 o preferencial dentre eles. Recomenda o uso combinado nas lesões duvidosas que sugerem lesão de maior risco oncológico, em lesões de difícil interpretação (como as NIC 2) e nas discordâncias histológicas entre os patologistas³¹.

3.8 O RISCO DE PERSISTÊNCIA, RECORRÊNCIA E/OU PROGRESSÃO DA NIC-AG

O câncer cervical é definido como uma doença de disparidades. Isto se deve à diferença encontrada na incidência de morbidade e de sua mortalidade entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento. Estudos revelam alto risco de desenvolver câncer cervical tanto em mulheres não rastreadas quanto naquelas submetidas a programas de rastreamento, e, o que parece ter significado relevante, é que a qualidade dos programas de rastreamento instituídos pelas comunidades que o estabelecem, resulta às vezes em precárias condições para a saúde feminina³².

O diagnóstico de câncer do colo uterino é emocionalmente traumático, entretanto é altamente passível de prevenção. Quando o câncer cervical é diagnosticado em estádios precoces ou na forma de sua lesão precursora (NIC 2/3), é altamente tratável e associado à longa sobrevida e boa qualidade de vida³².

O risco a longo prazo de câncer cervical em mulheres submetidas a tratamento de NIC 3, permanece em grande parte desconhecido. Com o emprego de registros médicos e de óbitos de todas as suecas, de 1958 a 2008, pesquisadores avaliaram a incidência e a mortalidade em mulheres sem e com NIC 3 previamente tratada. O risco de neoplasia invasora do colo uterino foi 2.4 vezes maior em mais de 150 mil mulheres tratadas para NIC 3 do que na população feminina em geral. O risco de óbito por câncer de colo uterino também foi 2.4 vezes maior em mulheres que já tinham tido NIC 3^{33,34}.

Ao longo das últimas décadas, muitos estudos epidemiológicos e laboratoriais tem demonstrado que o câncer cervical é uma doença complexa, relacionada a vários determinantes genéticos e ambientais^{5,6}. Apesar do adequado tratamento da lesão precursora, a recorrência da NIC irá acontecer, em média, entre 5 a 35%, o que aumenta o risco para a neoplasia invasora^{7,35,36}.

A persistência de uma neoplasia intraepitelial cervical após tratamento conservador por conização ou ablação se deve provavelmente à falha do tratamento primário ou ao desenvolvimento de uma nova doença. Em outras palavras, isto se deve à doença residual ou à infecção sub-clínica por HPV que não foi erradicada³⁷⁻³⁹.

Fatores relacionados à neoplasia residual e recorrência após conização são o grau da NIC, margens comprometidas, idade, raça, número de gravidezes e nascimentos, nível sócio-econômico, hábito de fumar, status marital e associação com HPV^{35,36,40}. Entretanto,

nem todos esses fatores são mencionados em todos os artigos e seu significado clínico exato ainda necessita ser estabelecido^{35,36,40}.

Os dados epidemiológicos relatados para recorrência ou persistência da doença precursora apresentam-se de forma variada na literatura, em sua maioria em estudos retrospectivos, o que limita as conclusões sobre o sucesso e/ou falha do tratamento. Entretanto, os estudos que relatam recorrência da doença cervical, com persistência da infecção por HPV de alto risco oncogênico, após a cirurgia de conização, são praticamente unânimes em afirmar que a persistência da infecção viral é um fator de risco independente^{37,41-43}.

A maioria dos autores associa os índices de recorrência da NIC-AG com uma grande variedade de fatores clínicos. E uma parte significativa deles correlaciona, de forma repetitiva, a presença de margens comprometidas no produto da conização e mulheres soropositivas para HIV com este pior resultado^{36,39,44-52}.

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) representa um importante problema de saúde pública no mundo. Atualmente, a presença de câncer cervical define o diagnóstico de Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) em mulheres soropositivas, devido à alta prevalência e incidência da infecção por HPV e de NIC em mulheres soropositivas^{53,54}.

Uma mulher infectada pelo HIV tem de 2 a 4 vezes mais chance de ter uma infecção pelo HPV que outra soronegativa, e os índices de CD4 menores de 200, associados à alta carga viral, aumentam em 3 vezes o risco de co-infecção HPV-HIV, quando comparada a uma mulher soronegativa, e também da persistência e progressão da NIC-AG, mesmo quando adequadamente tratada⁵³⁻⁵⁵.

Considerando o tipo de tratamento realizado para a NIC-AG e o risco de doença residual, é quase unanimidade que as margens comprometidas do produto de conização são um fator preditor de falha terapêutica. Alguns atribuem tanto à margem ectocervical quanto à endocervical a associação com a persistência da doença^{36,39,43-48,50,56} e outros atribuem exclusivamente à margem endocervical um risco aumentado⁴⁶⁻⁴⁸.

Estudos demonstram que o risco de doença residual após um ano do tratamento, com margens comprometidas, é cerca de 11 vezes maior do que entre as pacientes com margens livres, e que o risco absoluto de apresentar doença residual ao longo do primeiro ano pós tratamento é em torno de 29% naquelas mulheres com margens comprometidas, enquanto no segundo ano fica em torno de 6%⁵⁷.

Não é possível prever, até o presente momento, quais casos de NIC irão progredir ou regredir. Seguimento regular por citologia pode proporcionar boa proteção através da detecção das alterações celulares e conseguir, com isso, significativa redução nos índices de morbi-mortalidade do câncer do colo uterino, entretanto, a relação custo-efetividade deste seguimento ainda está em debate²⁷.

Além da recorrência e/ou persistência da NIC nos primeiros anos de seguimento, as mulheres que foram tratadas de NIC 2/3 permanecem em risco de desenvolver um carcinoma invasivo por um longo período de tempo, sendo por isso o seguimento prolongado necessário⁷.

Um grande número de protocolos de seguimento tem sido recomendado. Estes incluem citologia, colposcopia, a combinação da citologia com a colposcopia e a testagem para a presença de DNA-HPV, todos testados numa grande variedade de intervalos⁷.

Revisões sistemáticas da *performance* do Teste DNA-HPV no seguimento pós-tratamento parece ser bom e excede aos resultados da CO. Em alguns estudos, a combinação do teste DNA-HPV com a citologia oncológica parece resultar no aumento da sensibilidade⁷.

3.8.1 A utilidade do p16INK4a na predição do risco de recorrência e/ou progressão da NIC-AG

As principais linhas de investigação associadas aos processos anteriormente mencionados para a ocorrência e a progressão da neoplasia cervical focam, sobretudo, a identificação de proteínas celulares/ teciduais ou circulantes, cuja expressão se encontre alterada em resposta à expressão das oncoproteínas virais. Nestes termos, o p16 parece ser um marcador promissor para identificar as diferenças biológicas entre as chamadas lesões precursoras do câncer de colo uterino e seu potencial evolutivo¹⁰.

Há algumas evidências científicas de que a positividade difusa do p16 em imunohistoquímica de espécimes histológicos de colo uterino com NIC pode ser um preditor de progressão da doença. Tsoumpou *et al*¹¹, em sua metanálise, relacionam a positividade difusa do p16 nas lesões de colo uterino com uma alta prevalência de progressão das lesões de baixo grau (NIC 1) para lesões de alto grau, ao longo de seu seguimento. Entretanto, sugerem que o número de estudos conclusivos é limitado.

Wang *et al*⁵⁸, em 2004, demonstraram boa correlação entre a positividade difusa do p16 e o risco de progressão para NIC 3 de lesões menores que NIC 2, mas concluíram

pela necessidade de estudos prospectivos com intenso follow-up para poder determinar a capacidade prognóstica do p16⁵⁸.

Ainda em 2004, Wang *et al*²⁷, pesquisando o risco de progressão da neoplasia cervical, concluíram que a superexpressão da p16 se relaciona diretamente com menor tempo de progressão para um carcinoma invasor e concluíram ser o p16 um valioso marcador na predição da progressão da doença cervical.

Em estudo mais recente, Liao⁵⁹ e da Costa⁶⁰ *et al*, estudando pacientes com diagnóstico de NIC 1 que não foram tratadas, identificaram que a superexpressão do p16 está fortemente associada com o risco de progressão para NIC-AG em mulheres com lesões de baixo grau.

Fonseca *et al*⁶¹ analisaram a capacidade do p16 de predição de recorrência da NIC-AG tratada e não evidenciaram diferença significativa na expressão do p16 entre as pacientes que tiveram e as que não tiveram recorrência da doença, porém, em seus resultados demonstraram que houve maior percentual de expressão difusa do p16 nos casos que recorreram, sugerindo que novos estudos seriam necessários para confirmar esta hipótese.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo Transversal com coleta de dados retrospectiva, registrado e aprovado no CEP do Hospital Erasto Gaertner em 2011 sob protocolo nº 2147 (anexo), com as pacientes que foram submetidas a conização do colo uterino, pela técnica de Cirurgia de Alta Frequência, no Serviço de Patologia Cervical do Hospital Erasto Gaertner, no período de janeiro de 2009 a agosto de 2011, por neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC 2 e 3), que já possuíam teste de genotipagem para HPV (Técnica de PCR convencional) e submetidas à avaliação imunohistoquímica para p16 .

4.1 DA SELEÇÃO DE PACIENTES, COLETA DE DADOS E AMOSTRA

4.1.1 Seleção de pacientes

Das 500 pacientes conizadas no período supra-citado, foram estabelecidos:

- **Critérios de inclusão:** todas as pacientes atendidas no Serviço de Patologia Cervical, com diagnóstico cito-histológico confirmado de neoplasia intraepitelial cervical grau 2 ou 3, que foram selecionadas para cirurgia de conização e uma vez realizado o procedimento, tiveram o produto histológico desta conização submetido a análise histológica; simultaneamente ao procedimento de conização tiveram material colhido para tipificação do DNA-HPV, com termo de consentimento informado assinado, ficando dispostas num banco de dados da parceria Patologia Cervical HEG/ Departamento de Imunogenética UFPR e confecção de novos blocos de parafina pela técnica de Microarranjos teciduais (TMA) para aplicação do p16.

- **Critérios de exclusão:** pacientes que não aceitaram participar do estudo não permitindo a tipificação do DNA-HPV, paciente com dados insuficientes de prontuários, paciente com seguimento inferior a 18 meses e blocos de parafina do produto de conização inadequados para coleta de amostragem para imunohistoquímica pela técnica de microarranjos teciduais, resultado histológico do produto de conização com cervicite, NIC 1 e carcinoma invasor.

4.1.2 A coleta de dados

A coleta de dados epidemiológicos foi realizada através da revisão sistemática dos prontuários eletrônicos das pacientes incluídas no estudo. Para as mesmas foram computados os dados epidemiológicos (a idade, hábito de fumar, soropositividade para HIV, tempo de seguimento clínico pós conização, presença de DNA-HPV e sorotipos virais presentes em cada amostra e diagnóstico de recorrência durante o seguimento), dados histológicos (diagnóstico histológico da biópsia de colo uterino e do produto histológico da conização), os dados relativos ao tratamento realizado (técnica da conização, análise das margens do produto da conização) e os dados relativos aos resultados imunohistoquímicos (resultados da análise quali-quantitativa do p16 aplicados às peças histológicas).

4.1.3 A população estudada (amostra)

a) Amostra global: foi considerada amostra global as pacientes selecionadas pelos critérios de inclusão/ exclusão. Esta seleção resultou num total de 262 pacientes, sendo 146 portadoras de NIC 2 e 116 portadoras de NIC3, das quais foram obtidos os fatores clínicos relacionados ao risco aumentado para recorrência da doença;

b) Amostra de pacientes com margens livres no produto de conização: foi considerada amostra de margens livres as pacientes dentro da amostra global que não apresentaram margens comprometidas no produto histológico de conização, com o intuito de evitar o viés de contaminação devido a presença de margens comprometidas, na literatura, ser um potencial viés de resultados para análise dos fatores de risco para recorrência. Excluindo-se estas pacientes com margens comprometidas, este segundo braço do estudo resultou num total de 231 pacientes, sendo 133 portadoras de NIC 2 e 98 portadoras de NIC 3.

c) Amostra de pacientes de TMA (técnica de microarranjos teciduais): O último e terceiro braço do estudo foi o grupo de pacientes resultantes do preparo das lâminas de TMA para aplicação do p16 dentro da amostra global. Este, após exclusão dos casos com problemas técnicos (blocos de parafina em más condições de conservação, lâminas de HE em más condições técnicas de identificação, perda de material durante a coleta da amostra para TMA, perdas técnicas durante o processo de aplicação do p16), resultou numa amostra final de 192 pacientes, sendo 102 casos de NIC 2 e 90 casos de NIC 3.

Realizado cálculo do poder da amostra para 90% e a amostra foi pertinente (neste cálculo uma amostra de 176 pacientes seria necessária para representar um poder amostral de 90%). Esta amostra de 192 mulheres resultou num poder de amostra de 93.7%.

Estes 3 grupos foram avaliados de forma individual e depois comparados entre si para identificar os fatores clínicos realmente significativos para a recorrência da doença e então correlacionados com a expressão do p16.

Obs: Solicitado, neste ponto, dispensação, por parte da Comissão de Ética, do termo de consentimento informado e autorização por parte das pacientes cujas peças histológicas seriam utilizadas, pois não haveria nenhum prejuízo por parte do tratamento atual e futuro e os novos blocos confeccionados ficariam arquivados no HEG, mantendo todo o produto anátomo-patológico da paciente arquivado em conjunto com os blocos originais.

4.2 GENOTIPAGEM PARA HPV

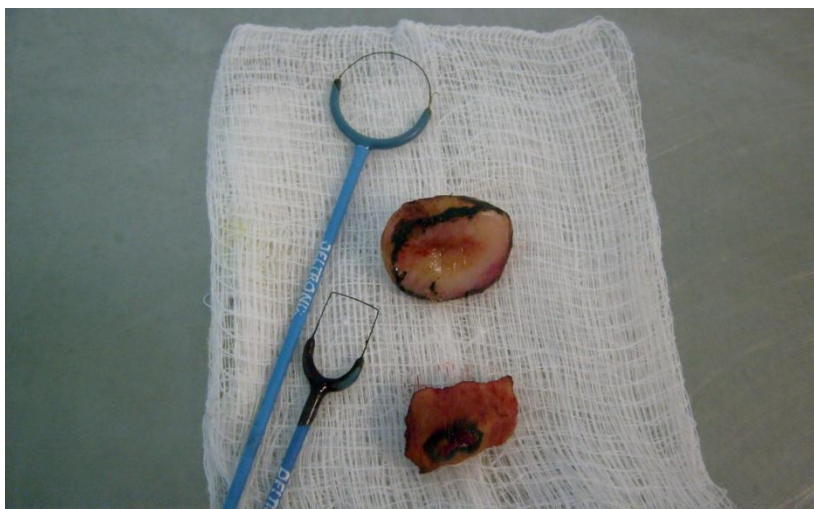
A genotipagem para HPV foi realizada nas pacientes que concordaram com sua realização, na data e previamente a realização da conização, após assinatura de termo de consentimento esclarecido. Todas as pacientes selecionadas foram submetidas a genotipagem para HPV de Alto Risco Oncogênico pela técnica de PCR convencional, em um kit que tipificava 18 tipos diferentes de HPV: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82 (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA).

4.3 A TÉCNICA DA CONIZAÇÃO E A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

4.3.1 Técnica de Conização

A conização foi realizada por meio da técnica de Cirurgia de Alta Frequência (CAF/LEEP), sob anestesia local, em 2 peças (margem ectocervical e margem endocervical), com as margens verdadeiras marcadas por tinta nanquim antes do envio para análise histopatológica (figura 2). A cirurgia foi realizada de forma ambulatorial e as pacientes retornaram para revisão pós-operatória em 20 dias e depois seguimento clínico semestral.

Figura 2 – Produto de conização (técnica de CAF), em 2 peças (margem ectocervical e endocervical), com margens verdadeiras marcadas por tinta nanquim e alças de CAF.

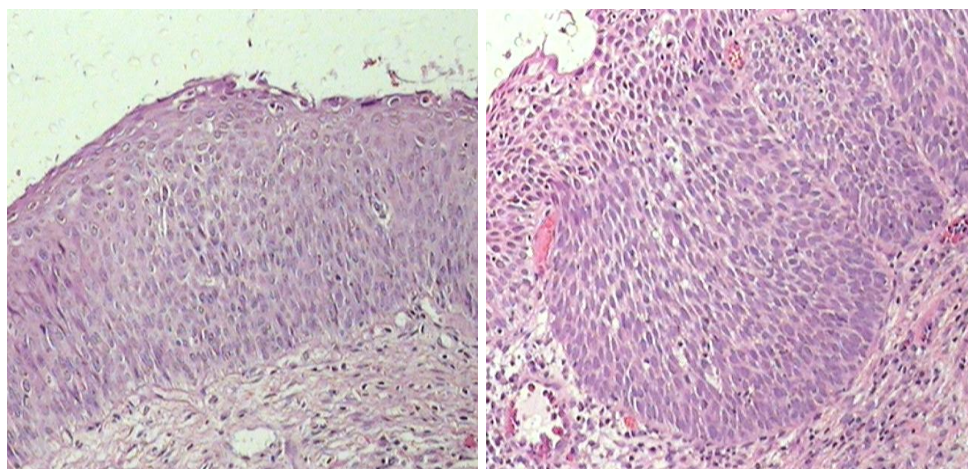


Fonte: Autor (2011)

4.3.2 Avaliação histopatológica das peças de conização

O produto histológico da conização foi devidamente preparado e corado pela técnica convencional de Haematoxilina-eosina (HE) no momento da conização. Durante a execução desta pesquisa seus resultados foram revisados por um segundo patologista para confirmação do diagnóstico anátomo-patológico inicial. Os casos discordantes entre os patologistas foram excluídos para evitar viés de resultado. (Figura 3).

Figura 3 – Representação histológica de NIC 2 e NIC 3 em lâminas coradas pela técnica de Haematoxilina-eosina (Serviço de Anatomia-Patológica do HEG).



NIC 2 (aumento 100x)

NIC 3 (aumento 100x)

Fonte: Serviço de Anatomia Patológica HEG (2011)

4.4 A REALIZAÇÃO DOS ARRANJOS MICROTECIDUAIS E APLICAÇÃO E LEITURA DO p16 IMUNOHISTOQUÍMICA

4.4.1 Confeção do TMA e técnica de aplicação do Imunomarcador p16^{INK4a}

Para aplicação do biomarcador p16^{INK4a}, nos blocos de parafinas do produto de conização destas pacientes selecionadas, foram preparados novas lâminas pela técnica de microarranjos teciduais (TMA/*tissue microarray*), pela equipe de pesquisa.

Para confecção das lâminas de microarranjos teciduais, a partir dos blocos de parafina originais dos produtos de conização, foram avaliadas todas as lâminas feitas a partir desses blocos e demarcada a área de lesão mais representativa com caneta de retroprojektor. A área marcada foi colocada sobre o bloco correspondente e o material a ser retirado, identificado. Com pinça do tipo *punch*, de cinco milímetros de diâmetro e ligeiramente aquecida, foi retirado do bloco de parafina a área demarcada e colocada nas caixas de *arrays*, seguindo uma ordem previamente diagramada para posterior leitura e, então, confeccionado novo bloco, o bloco de *tissue*.

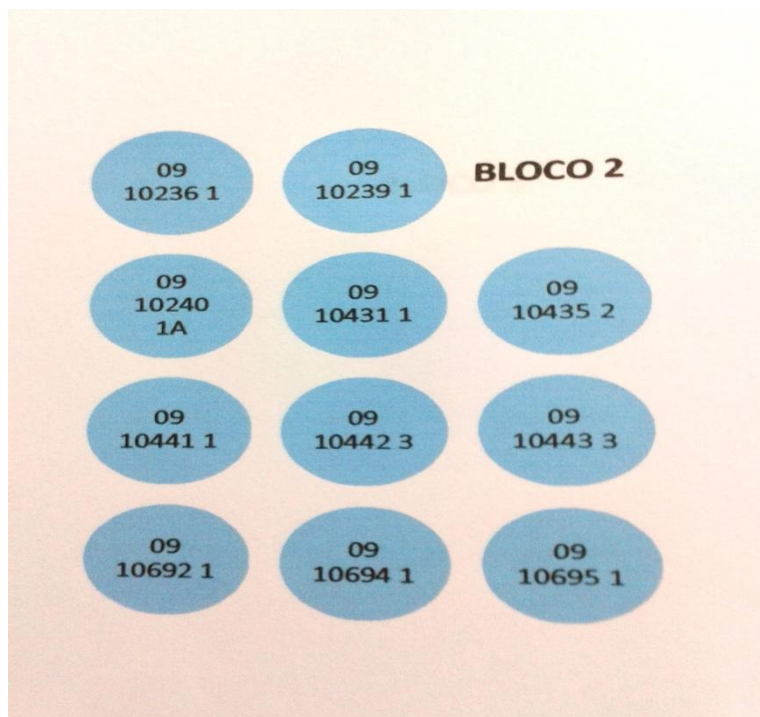
Cada lâmina de *tissue* foi confeccionada com dez amostras, sendo uma de cada paciente e, após a totalização das lâminas, então foi aplicado o imunomarcador p16 e leitura do resultado a partir de critérios já pré-estabelecidos pela literatura (figura 4).

O *kit* de imunohistoquímica utilizado foi o Anticorpo p16 pré-diluído (monoclonal de rato, clone 6H12, diluído 1:100, Novocastra[®]/ UK).

Após preparo das lâminas, estas foram submetidas aos seguintes processos: desparafinização; recuperação antigênica com citrato pH 6,0 ; bloqueio de peroxidase endógena; diluição de cada anticorpo a 1:100 e aplicação do anticorpo primário sobre cada lâmina, depois lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) específico de cada imunomarcador; aplicação do anticorpo secundário e, finalmente, aplicação de Diaminobenzidina (DAB) específico e contracoloração.

Ao final do preparo, totalizaram 21 lâminas para leitura da reação imunohistoquímica e sua forma de diagramação pode ser vista na figura 4.

Figura 4 – Diagramação das lâminas de TMA leitura dos resultados do p16.



Fonte: autor (2016)

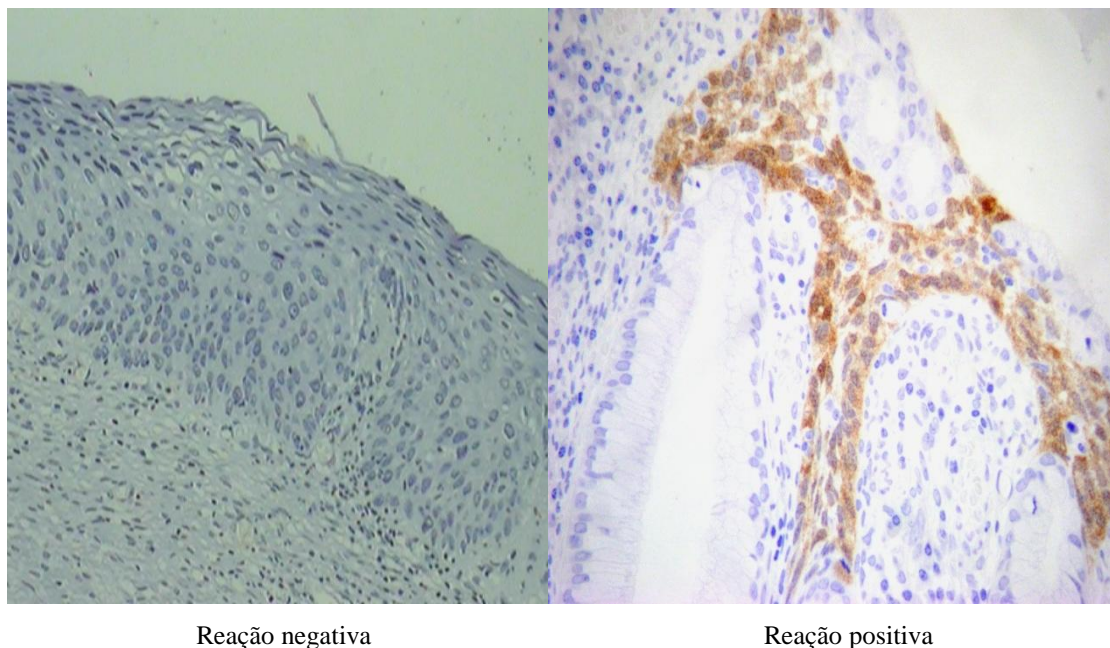
4.4.2 Leitura do Imunomarcador

Os elementos imunohistoquímicos foram definidos em semelhança a pesquisa de Fonseca *et col*⁶¹, Klaes *et col*⁶², Jung *et col*⁶³ e foi subdividida em análise qualitativa e quantitativa.

Foram determinados os seguintes elementos imunohistoquímicos: positividade da reação e sua intensidade (análise qualitativa), padrão de positividade da reação (análise quantitativa) e imunolocalização (núcleo/ citoplasma).

A análise qualitativa foi dividida em reação positiva e negativa. A reação foi considerada positiva quando impregnou de coloração amarronada os núcleos e/ou o citoplasma de pelo menos 25% da amostra viável e avaliável do tumor. A reação negativa foi considerada quando não houve nenhuma coloração característica da reação imunohistoquímica (figura 5).

Figura 5 – Expressão imunohistoquímica quantitativa para p16 em peças de conização de colo uterino com NIC-AG

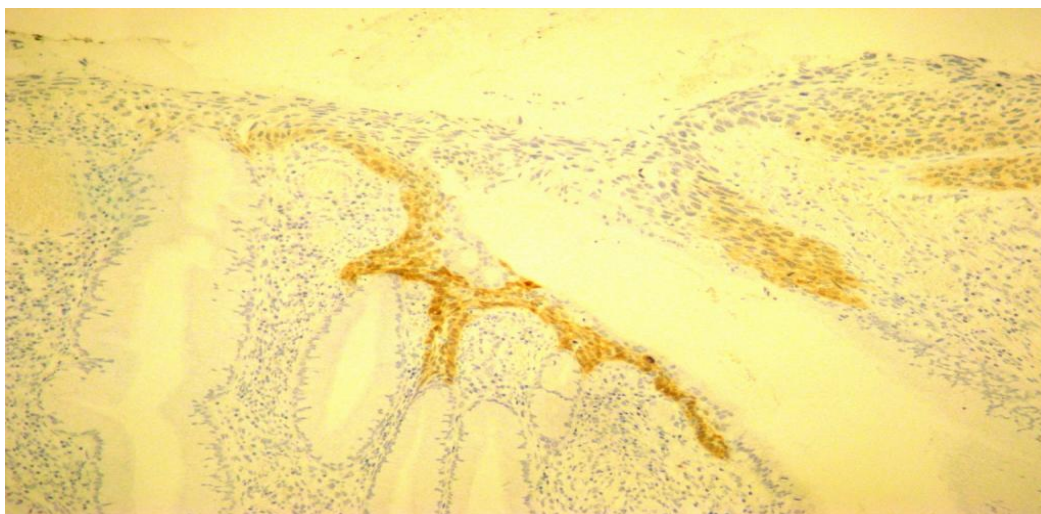


A reação positiva foi dividida em dois grupos: positiva forte (quando a intensidade da coloração foi semelhante ao controle utilizado) e positiva fraca (quando a intensidade da coloração foi substancialmente menor que a do controle positivo utilizado, só podendo ser observada com clareza com aumento de 100 vezes).

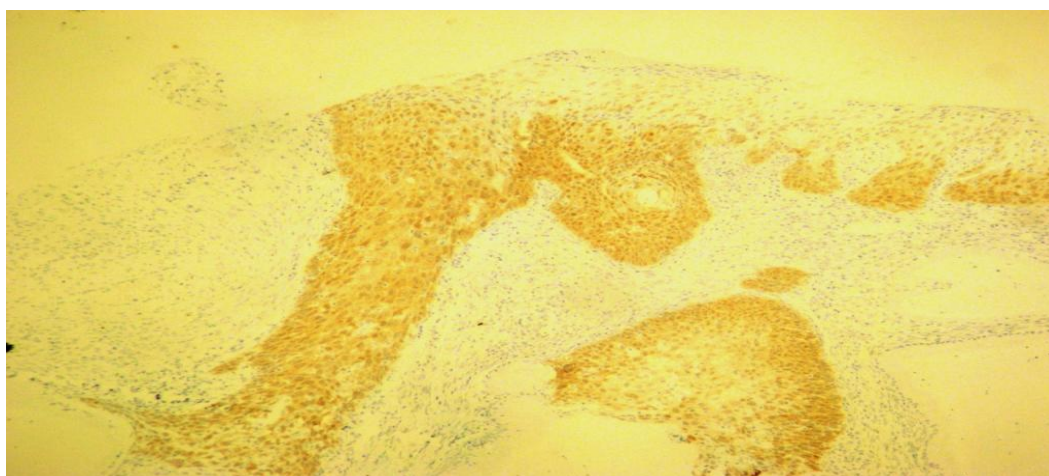
A análise quantitativa foi classificada como: positividade difusa (a reação foi positiva numa extensão que englobava mais de 50% da amostra viável e avaliável), positividade multifocal intensa (a reação foi positiva numa extensão que englobava entre 25 e 50% da amostra viável e avaliável do tumor) e positividade multifocal leve (a reação foi positiva numa extensão que englobava menos de 25% da amostra viável e avaliável), e esses 3 padrões de expressão do p16 podem ser vistos na figura 6 a frente.

Ainda foi determinado a imunolocalização e ficou assim classificado: padrão nuclear de positividade, padrão citoplasmático de positividade, padrão nuclear e citoplasmático de positividade simultâneos.

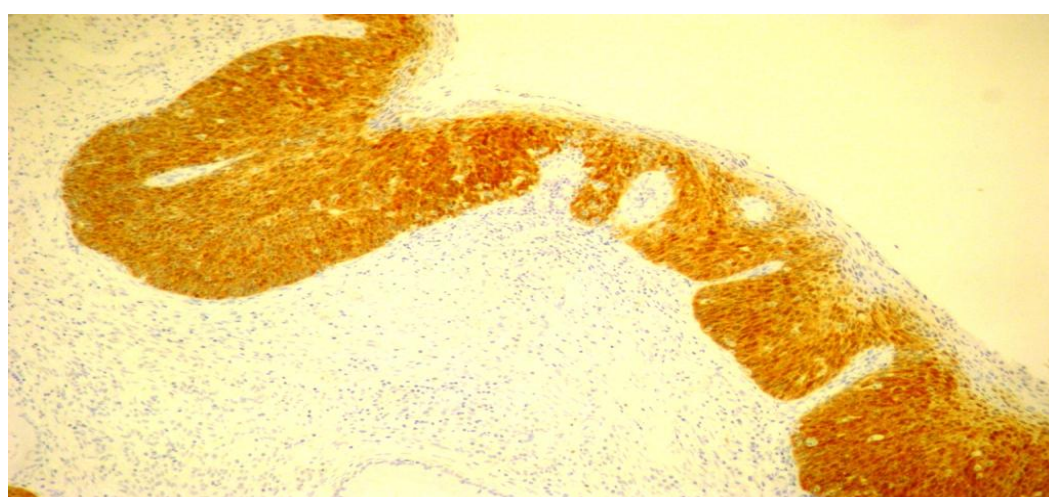
Figura 6- Representação da expressão imunohistoquímica quantitativa para p16 em peças de conização de colo uterino com NIC-AG.



Reação multifocal leve (aumento 100x)



Reação multifocal intensa (aumento 100x)



Reação multifocal intensa (aumento 100x)

Fonte: o autor (2016)

4.5 FATORES DE RISCO CLÍNICO PARA RECORRÊNCIA ANALISADOS

Das pacientes incluídas no estudo foram extraídos os dados clínicos correspondentes a idade, hábito de fumar, grau da NIC, sorotipo viral (HPV), quantidade de sorotipos virais por amostra, soropositividade para HIV e comprometimento das margens do produto de conização e relacionados ao risco de recorrência.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Foi realizada utilizando-se o programa SPSS 19.0/ IBM

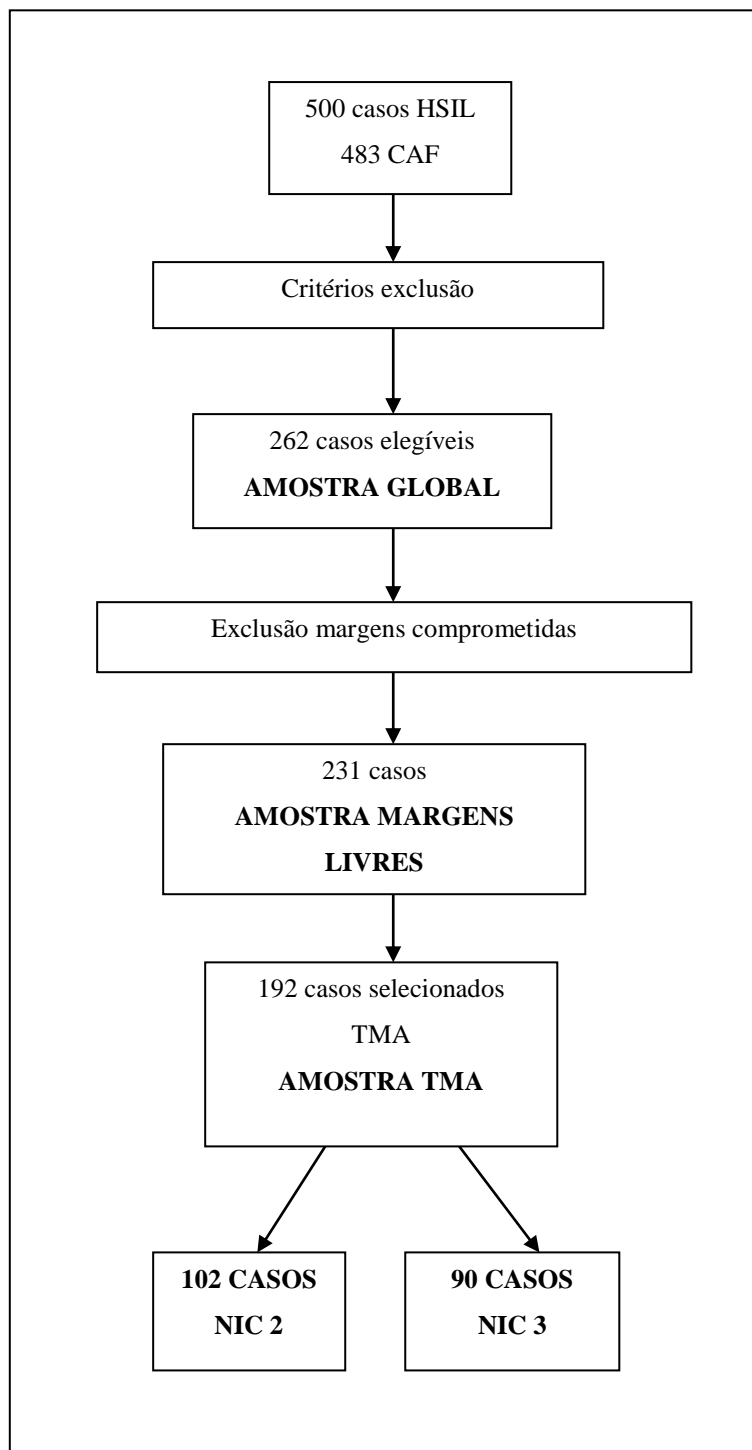
Na análise da expressão do imunomarcador, a superexpressão do p16 foi feita comparativamente entre os grupos através do teste do Qui-Quadrado e/ou Teste Exato de Fischer e o valor de p calculado e este era considerado significativo quando $p < 0.05$.

Foram ainda calculados o Valor preditivo positivo (VPP), o Valor preditivo negativo (VPN), a sensibilidade, a especificidade e a acurácia da expressão do p16 para predizer a recorrência e as diferenças biológicas entre os casos de NIC 2 e NIC 3.

O Teste do X^2 também foi utilizado para avaliar a associação entre variáveis para análise dos fatores clínicos preditores de recorrência e foi considerado significativo quando $p < 0.05$. Foi calculado o Risco Relativo para recorrência destas variáveis.

A amostra real ficou então distribuída conforme demonstra o Diagrama de Consort (figura 7).

Figura 7 – Diagrama de Consort (Fluxograma da pesquisa)



5 RESULTADOS

Das 500 pacientes selecionadas para conização no período supra-citado, com diagnóstico histopatológico de NIC 2 e NIC 3, 482 foram submetida a técnica de Cirurgia de Alta Frequência e destas, 262 simultaneamente aceitaram coletar material para tipificação de HPV pela técnica de PCR e tiveram seguimento clínico mínimo de 18 meses. Dentre as 262 mulheres elegíveis, 146 (56%) tinham diagnóstico histológico de NIC 2 e 116 (44%) tinham o diagnóstico histológico de NIC 3.

Destas 262 pacientes foram excluídas as pacientes com margens comprometidas e resultou no segundo braço do estudo com 231 mulheres, sendo 133 (58%) casos de NIC 2 e 98 (42%) casos de NIC 3.

O terceiro e principal braço do estudo, composto pelas pacientes do TMA resultou em 192 mulheres, sendo 102 (53%) casos de NIC 2 e 90 casos de NIC 3 (47%).

Os dados epidemiológicos da amostra principal (TMA) podem ser vistos na tabela 1.

TABELA 1 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA AMOSTRA TMA

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS		
Idade	35±6 (22-48)	
Tabagismo	Sim	76/183 (42%)
	Não	107/183 (58%)
HIV	Sim	09/177 (5%)
	Não	168/177 (95%)
Margens conização	Livres	165/192 (86%)
	Comprometidas	27/192 (14%)
Presença DNA-HPV	Positivo	185/192 (96%)
	Negativo	07/192 (4%)
Quantidade de DNA-HPV/amostra	Único	121/185 (65%)
	Mais de 1	64/185 (35%)
Grau NIC	NIC 2	102/192 (53%)
	NIC 3	90/192 (47%)
Reação p16	Positivo	171/192 (89%)
	Negativo	21/192 (11%)

DNA-HPV 16 foi encontrado em 63% das amostras e foi seguido pelos tipos 31, 33, 35, 52 e 18. Os outros subtipos representaram menos de 5% da amostra.

Foram identificadas 14% (27/192) de margens comprometidas no produto histológico da conização e 86% (165/192) de margens livres.

O índice de recorrência neste grupo ficou em 10% (20/192).

O comprometimento das margens resultou em um índice de recorrência de 37% e 6% para margens livres ($p < 0.001$).

A expressão do imunomarcador p16 demonstrou aumento gradual de sua expressão diretamente proporcional ao aumento do grau da NIC. Entretanto não houve diferença estatística no percentual de expressão p16 entre as pacientes do grupo que recorreram e as do grupo que não recorreram e entre aquelas portadoras de NIC 2 e de NIC 3, conforme pode ser visto na tabela 2.

TABELA 2 – ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO p16 COM TESTES CAPAZER DE PREDIZER AS DIFERENÇAS ENTRE NIC 2 E 3 E O RISCO DE RECORRÊNCIA DA NIC-AG TRATADA

	<u>REAÇÃO</u> <u>IMUNOHISTOQUÍMICA</u> <u>PARA P16</u>	<u>NIC 2</u>	<u>NIC3</u>	<u>SEM</u> <u>RECORRÊNCIA</u>	<u>COM</u> <u>RECORRÊNCIA</u>
Análise qualitativa	Negativa	14% (14/102)	08% (7/90)	12% (20/172)	05% (1/20)
	Positiva	86% (88/102)	92% (83/90)	88% (152/172)	95% (19/20)
	Significância	p= 0.18		p=0.70	
Análise quantitativa	Negativa	14% (14/102)	08% (7/90)	12% (20/172)	05% (1/20)
	Multifocal leve	15% (15/102)	05% (5/90)	11% (19/172)	05% (1/20)
	Multifocal intensa	42% (43/102)	31% (28/90)	36% (63/172)	40% (8/20)
	Difusa	29% (30/102)	56% (50/90)	41% (70/172)	50% (10/20)
	Significância	p= 0.02		p= 0.62	
VPP		48%		11%	
VPN		66%		95%	
Sensibilidade		92%		95%	
Especificidade		13%		11%	
Acurácia		89%		93%	

O p16 foi expresso em 86% das NIC 2 e 92% das NIC 3. A análise quantitativa da expressão do p16 resultou em 29% dos casos de NIC 2 com ausência de expressão ou

expressão multifocal leve, mas estes mesmos resultados repetiram-se em apenas 13% dos casos de NIC 3, demonstrando seu alto valor preditivo negativo, embora com baixo valor preditivo positivo para diferenciar entre NIC 2 e 3, como pode ser visto na tabela 3.

Os resultados de VPP, VPN, sensibilidade, especificidade e acurácia do p16 para diferenciação entre NIC 2 e 3 e para avaliar risco de recorrência pode ser visto na tabela 3.

Na análise quantitativa, subdividindo a expressão do p16 em 2 categorias, negativa ou multifocal leve e multifocal intensa ou positividade difusa, e correlacionado com a recorrência da NIC-AG, obteve-se: 11% de VPP, 95% de VPN, 78% de acurácia e um RR de 2.33 para predizer a recorrência.

Foram analisados a seguir, individualmente, os outros 2 grupos de amostras, a global e a de margens livres, para determinar os fatores clínicos de recorrência.

Na amostra global, a média de idade foi 35 ± 6 anos, com a mínima de 19 e a máxima de 48 anos, sendo 78% delas maiores de 30 anos; 38% (95/249) eram fumantes; 5% (11/242) delas eram soropositivas para HIV e 95% delas eram positivas para DNA-HPV (250/262). Entre as mulheres portadoras de DNA-HPV positivo, 66% (165/250) eram portadoras de apenas um tipo de HPV na mesma amostra e 34% (85/250) eram portadoras de mais de 1 tipo de HPV na mesma amostra.

HPV 16 foi encontrado em 63% da amostra e foi seguido pelos subtipos: HPV 31 (20%), HPV 33 (12%), HPV 35 (11%), HPV 52 (9%) e HPV 18 (8%). Os outros subtipos representaram menos de 5% da amostra.

Foi identificado um percentual de 12% (31/262) de margens comprometidas no produto histológico da conização e 88% (231/262) de margens livres. Entre as 31 mulheres com margens comprometidas, 15 estavam comprometidas na margem ectocervical, 15 na endocervical e 1 tinha ambas as margens comprometidas.

O índice de recorrência global foi de 9.5% (25/262).

Em 84% (21/25) dos casos em que a recorrência foi confirmada, DNA-HPV 16 foi identificado.

Não houve nenhum caso de recorrência em mulheres com menos de 25 anos e 84% (21/25) das recorrências aconteceram em mulheres com mais de 30 anos.

O comprometimento das margens do produto de conização foi o único dado relacionado ao tratamento cirúrgico realizado que se correlacionou com a recorrência estatisticamente ($p < 0.0001$) e pode ser visto na tabela 3.

TABELA 3 - RELAÇÃO ENTRE O COMPROMETIMENTO DAS MARGENS DO PRODUTO HISTOLÓGICO DE CONIZAÇÃO COM AS TAXAS DE RECORRÊNCIA E O RISCO RELATIVO PARA RECORRÊNCIA.

MARGEM COMPROMETIDA	CASOS SEM RECORRENCIA (N=237)	CASOS COM RECORRENCIA (N=25)	TAXA DE RECORRENCIA/ RISCO RELATIVO (RR)
Ambas livres	216	15	6.5% (15/237) RR= 0.5 (IC95%: 0.1-1.9)
Ectocervical	11	4	27% (4/15) RR= 4.1 (IC95%: 1.5-10)
Endocervical	10	5	33% (5/15) RR=5.1 (IC95%: 2.1-12)
Ambas comprometidas	0	1	100% (1/1) RR=16 (IC95%: 9.4-25)
	237	25	

Nota: 12% margens comprometidas / 9.5% recorrência global / valor $p < 0.001$

Entre as mulheres da amostra com margens livres na conização, a média de idade foi 34 ± 6 anos, com mínima de 19 e máxima de 48 anos; houveram 133 (58%) casos de NIC 2 e 98 (42%) casos de NIC 3; 39% (86/213) mulheres eram tabagistas; 4% (8/212) eram soropositivas para HIV e 95% delas eram DNA-HPV positivas (219/231). Entre as mulheres portadoras de DNA-HPV positivo, 64% (140/219) eram portadoras de apenas 1 tipo de DNA-vírus na mesma amostras e 36% (79/219) eram portadoras de mais de 1 tipo de DNA-vírus na mesma amostra.

DNA-HPV 16 foi encontrado em 62% (143/231) das amostras e o índice de recorrência ficou em 6.5% (15/231).

Após análise de cada grupo individualmente, buscando identificar os fatores clínicos relacionados à recorrência da NIC-AG tratada, os dados destes 3 grupos (Amostra global, Amostra com margens livres e Amostra TMA) foram então comparados entre si, e demonstraram que além das margens comprometidas também resultaram em fatores clínicos para recorrência da NIC-AG tratada, a soropositividade para o HIV e a presença de DNA-HPV 16, de forma repetida nos 3 grupos e estes dados podem ser vistos na tabela 4.

TABELA 4 - ASSOCIAÇÃO DOS DADOS RELACIONADOS A RECORRÊNCIA DA NIC-AG TRATADA POR CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS (A - Amostra global; B - Amostra de margens livres à conização; C - Amostra TMA).

<u>A</u>	<u>DADOS GLOBAIS</u>	<u>TAXA RECORRÊNCIA</u>	<u>VALOR P</u>
Grau NIC			
NIC 2	56% (n=146)	07% (10/146)	0.13
NIC 3	44% (n=116)	13% (15/116)	
Soropositividade HIV			
Positivo	11/242	50% (5/11)	0.00
Negativo	231/242	08% (8/231)	
Número HPV			
Único	66% (165/250)	09% (14/165)	0.64
Mais de 1	34% (85/250)	12% (10/85)	
Presença DNA-HPV 16			
Positivo	63% (164/262)	13% (21/164)	0.02
Negativo	37% (98/262)	04% (4/98)	
<u>B</u>	<u>GRUPO MARGENS LIVRES</u>	<u>TAXA DE RECORRÊNCIA</u>	<u>VALOR DE P</u>
Grau NIC			
NIC 2	58% (n= 133)	05% (7/133)	0.42
NIC 3	42% (n= 98)	08% (8/98)	
Soropositividade HIV			
Positivo	8/212	50% (4/8)	0.00
Negativo	204/212	05% (10/204)	
Número HPV			
Único	64% (140/219)	04% (5/140)	0.07
Mais de 1	36% (79/219)	11% (9/79)	
Presença DNA-HPV 16			
Positivo	62% (143/231)	09% (13/143)	0.05
Negativo	38% (88/231)	02% (2/88)	
<u>C</u>	<u>GRUPO TMA</u>	<u>TAXA RECORRÊNCIA</u>	<u>VALOR P</u>
Grau NIC			
NIC 2	53% (n=102)	08% (8/102)	0.24
NIC 3	47% (n=90)	13% (12/90)	
Soropositividade HIV			
Positivo	9/177	33% (3/9)	0.05
Negativo	168/177	09% (15/168)	
Número HPV			
Único	65% (121/185)	10% (12/121)	0.62
Mais de 1	35% (64/185)	12% (8/64)	
Presença DNA-HPV 16			
Positivo	63% (121/192)	14% (17/121)	0.04
Negativo	37% (71/192)	04% (3/71)	

Os dados não evidenciaram diferença estatística na expressão do p16 quando correlacionado às variáveis HIV, margens do produto de conização, quantificação de DNA-HPV por amostra e presença de DNA-HPV 16 e estes resultados podem ser conferidos na tabela 5.

TABELA 5 – ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO p16 INK4A COM OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS À RECORRÊNCIA DA NIC-AG TRATADA POR CAF.

p16INK4a		NEGATIVA	POSITIVA	VALOR p
Margens do cone	Livres	10% (17/165)	90% (148/168)	0.50
	Comprometidas	15% (4/27)	85% (23/27)	
Soropositividade HIV	Negativa	13% (21/168)	87% (147/168)	0.60
	Positiva	00% (0/9)	100% (9/9)	
Número DNA-HPV/ amostra	Único	12% (14/121)	88% (107/121)	0.80
	Mais de 1	09% (6/64)	91% (58/64)	
Positividade DNA-HPV 16	Negativa	13% (9/71)	87% (62/71)	0.63
	Positiva	10% (12/121)	90% (109/121)	

Baseado nestes dados foi criado um “Escore de Risco” para recorrência da NIC-AG tratada por Cirurgia de Alta Frequência, e as margens comprometidas do produto de conização continuaram sendo o fator clínico mais relevante para análise prognóstica da recorrência, tendo o p16 isoladamente um risco relativo de 2. Mas quando analisado em conjunto com os outros fatores de risco, este RR passa a ser de 4. Este escore pode ser visto na tabela 6.

TABELA 6 - ESCORE DE RISCO PARA AVALIAR A PROBABILIDADE DE RECORRÊNCIA DA NIC-AG TRATADA POR CONIZAÇÃO.

FATOR PROGNÓSTICO	TAXA DE RECORRÊNCIA	RISCO RELATIVO (RR)
* <u>Todos os fatores negativos</u>	12%	0.25 (IC95: 0.02-2.24)
p16 (INK4A) positivo	11%	2.33 (IC95: 0.3-16)
DNA-HPV 16 positivo	14%	3.2 (IC95: 1.0-10)
HIV positivo	50%	3.7 (IC: 1.3-10)
Margens comprometidas	37%	6.1 (IC95: 2.8-13)
* <u>Todos os fatores positivos</u>	50%	4.0 (IC95:0.4-39)

Todos estes resultados produzidos foram compilados em 3 artigos científicos, os quais já se encontram submetidos a 3 revistas médicas diferentes, aguardando análise pelo corpo editorial das mesmas e seus textos integrais podem ser conferidos nos anexos desta edição.

Essas produções científicas estão listadas abaixo, assim como as revistas para as quais foram submetidas:

1. “The role of HIV positive status as an independent factor for predicting the risk of recurrence of cervical HSIL”, submetido à revista International Journal of Infectious Diseases (IJID);
2. “Prognostic factors related to recurrence after conization due to high grade cervical intraepithelial neoplasia”, submetido à revista Cancer Causes and Control;
3. “The role of p16 and risk factors in the management of High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (HSIL) to improve the diagnosis and predict the differences in biological evolution”, submetido a revista Cancer Research.

O projeto piloto realizado previamente a esta tese gerou um publicação que foi efetivada na edição de janeiro de 2016, na revista do CBC (Colégio Brasileiro de Cirurgiões) e foi intitulada “The role of p16^{INK4A} and p53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment”.

6 DISCUSSÃO

A história natural da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) é extremamente variável. Se não tratada, ela pode regredir para tecido normal, persistir como NIC ou progredir para câncer invasor. Muitos estudos têm demonstrado que aproximadamente um terço a metade dos casos de NIC 1 e NIC 2 regredem espontaneamente se não tratados e a maioria dos NIC 3 progridem^{5,11,27,64,65}.

Não é possível até o presente momento prever quais casos irão progredir ou regredir. A probabilidade de uma atipia epitelial progredir para um câncer invasor aumenta com a severidade da atipia, mas não acontece em todos os casos, refletindo a diversidade biológica da doença^{5,11,27,64,65}.

A NIC 2, entretanto, é uma lesão *borderline*, clinicamente comportando-se como NIC 1 em algumas situações e como NIC 3 em outras, e ocorrendo com maior frequência em mulheres jovens. A fisiopatologia da infecção e da reinfecção pelo HPV e o comportamento biológico da NIC 2 ainda não é bem compreendido. Um melhor conhecimento dos fatores relacionados à evolução da NIC 2 permitirão melhores escolhas clínicas para seu manejo⁶⁵.

O progresso no conhecimento da carcinogênese cervical relacionada ao HPV permitiu a identificação de marcadores biológicos que poderiam incrementar os métodos de *screening* do câncer de colo uterino, e o p16 parece ser um dos mais promissores deles. Entretanto, não há ainda um consenso sobre o real valor clínico atribuível a uma amostra “p16 positiva”¹¹.

Vários estudos têm demonstrado que o p16 parece ser um útil marcador para o diagnóstico da neoplasia intra-epitelial cervical, pois sua expressão parece relacionar-se diretamente com o grau da neoplasia cervical^{11,58,66-72}. Outros estudos, entretanto, também correlacionam sua expressão com a presença de HPV de alto risco oncogênico, além do grau da neoplasia^{11,66,70,72}.

Há ainda alguns estudos que correlacionam sua expressão com o risco de recorrência e/ou prognóstico da doença^{11,27,58,60,61,72-77}.

Wang *et al*²⁷ analisaram o percentual de expressão do p16 entre pacientes com NIC e câncer comparados com pacientes sem lesões histológicas, e evidenciaram uma expressão significativamente maior em casos de NIC e câncer. Demonstraram ainda uma prevalência de 40% do DNA-HPV 16, sendo que nos casos em que a doença cervical persistiu ou progrediu houve persistência do mesmo tipo viral. Concluíram também que

nos casos de doença que progredia para câncer, o tempo relacionado à progressão foi muito menor nos casos p16 positivos que nos negativos e, com isso, entenderam o p16 como um marcador prognóstico.

Outro estudo semelhante, publicado no mesmo ano, identificou pacientes que tinham diagnóstico inicial de NIC 1, com expressão difusa do p16 e que, no seguimento por 5 a 7 anos, evoluíram em 44% das vezes com infecção persistente por HPV e progressão para NIC 2 e 3, concluindo ser a positividade difusa do p16 um marcador de progressão da doença cervical relacionada ao HPV⁵⁸.

Queiroz *et al*⁶⁷ demonstraram que a expressão do p16 aumenta progressivamente do tecido normal para o câncer do colo uterino, o que, segundo eles, reforça a possibilidade do p16 ser um marcador prognóstico de risco. Ainda observaram que todos os casos de câncer invasivo e a grande maioria dos casos de NIC 2 e 3 eram positivos para p16, mas apenas 61% dos casos de NIC 1 expressavam o marcador. Entretanto, todos esses 61% dos NIC1 p16 positivos eram portadores de HPV de alto risco oncogênico, sugerindo haver um grupo de maior risco de progressão para o carcinoma invasor entre as lesões de baixo grau, e que poderiam ser detectadas pelo p16 e submetidas a um controle mais rigoroso.

O estudo atual tinha por objetivo identificar as diferenças biológicas entre NIC 2 e 3, uma vez que já parece bem estabelecido na literatura, há algum tempo, a relação das lesões de baixo grau e a expressão do p16 em relação ao prognóstico destas lesões, mas quase nada se tem em relação ao NIC 2, que tem um comportamento clínico muito variado, mas por falta de dados específicos que qualifiquem seu comportamento, é tratado como NIC 3, muitas vezes causando danos ao futuro reprodutivo destas mulheres.

Não foi possível, perante estes resultados, demonstrar com clareza, essas diferenças biológicas entre NIC 2 e 3 pela expressão do p16, de forma semelhante a alguns autores, que conseguiram evidenciar diferenças biológicas no espectro das NIC 1 e das NIC 2^{11,27,60,67,73,77}. Mas os dados demonstram claramente que as lesões p16 que expressam positividade difusa tem maior gravidade, uma vez que o percentual de sua expressão é maior tanto nos casos de NIC 3 quanto nos casos que mesmo adequadamente tratados, recorreram.

Ainda permanece um desafio a predição de que grupo de mulheres realmente poderá progredir para um carcinoma invasor de colo uterino, principalmente entre os casos de NIC 2 e, conseqüentemente, evitar danos ao futuro reprodutivo destas mulheres, ao mesmo tempo em que se incrementa suas expectativas de vida.

Guerra *et al*⁷⁵ debatem que o p16 é um marcador de proliferação celular com baixa especificidade para avaliar a progressão da doença, mas altamente expresso em lesões recorrentes e com alto valor preditivo negativo (VPN), uma vez que sua baixa expressão envolve baixo potencial de proliferação celular, atingindo, em seus resultados, um VPN de 100%, de forma semelhantes aos dados produzidos por este grupo de pesquisa em seu trabalho prévio⁶¹, e neste atual.

Em contrapartida, Motamedi *et al*⁷⁸, em estudo recente, analisou pacientes jovens, portadoras de HPV de alto risco oncogênico e p16 positivas, e concluiu ser a NIC 3 com estas características, uma lesão de pouca probabilidade para regressão espontânea.

Em contraste, ainda há uma grande heterogeneidade entre os resultados encontrados para quantificar a expressão do p16 em relação ao grau da neoplasia intraepitelial e os dados da literatura atual^{11,77}.

Tsompou *et al*¹¹ discutem o papel do p16 como um marcador de severidade da NIC. Para eles a expressão do p16 em casos de NIC 2 ocorre em torno de 44 a 92% e nos casos de NIC 3 entre 72 e 92%. Também discute que a positividade difusa parece demonstrar aumento do risco de progressão das lesões de baixo grau para lesões mais severas do colo uterino. Assim como casos de NIC 1 com positividade difusa progridem mais frequentemente para NIC 2-3, com VPP de 39% e VPN entre 85 e 96%. Da mesma forma, alguns casos de NIC 2 com positividade difusa progridem com mais facilidade para NIC 3¹¹.

Baseados em suas pesquisas, Tsompou *et al*¹¹ concluíram que apesar de haver boas evidências de que o p16 correlaciona-se com a severidade das anormalidades citológicas e histológicas, sua reprodutibilidade é limitada devido a pouca padronização dos resultados apresentados entre a maioria dos autores. Apesar disso um consenso precisa ser procurado para a validação da leitura do p16, de forma que este promissor marcador possa ser utilizado nas diferentes situações clínicas.

Foi uma limitação do estudo atual a relativa pequena quantidade de casos, devido a grande perda durante a confecção da imunohistoquímica, porém a NIC é uma lesão superficial, e muitas vezes focal, o que dificulta a confecção de múltiplas amostras em um grande número de biópsias. Mas Wang *et al*⁵⁸, já em 2004, discutia a dificuldade de múltiplas amostragens nesta patologia, uma vez que se trata muitas vezes de lesões superficiais, focais e às vezes pequena quantidade de tecido retirada.

Considerando todos estes dados, parece que a expressão do p16 na cérvix uterina demonstra forte relação com a infecção por HPV e o desenvolvimento da neoplasia

intraepitelial cervical e o grau da neoplasia, mas ainda não pode ser considerado um marcador capaz de prever a doença recorrente e as diferenças biológicas entre NIC 2 e 3 de forma enfática.

A sua expressão de forma difusa parece evidenciar uma tendência de correlacionar as diferenças biológicas entre NIC 2 e 3 e o risco de recorrência, e talvez um estudo com número maior de casos possa comprovar esta hipótese. No entanto, no Brasil, onde os recursos financeiros para pesquisas são escassos, e produções como esta tem um custo muito elevado, realizar grandes Coortes é muito difícil!

Devido ao p16 não ter demonstrado, isoladamente, nesta pesquisa, uma razão de risco elevada para a predição da recorrência da NIC-AG tratada, os autores propuseram algo inédito, um Escore de Risco, onde, conjuntamente com a análise de outros fatores clínicos, o p16 pudesse estabelecer o risco de recorrência da lesão tratada.

Alguns autores^{26,71,77} sugeriram o uso combinado de biomarcadores para aumentar a chance de melhor identificar os casos de NIC com maior risco de progressão.

Ekalsananan *et al*²⁶ concluíram que a associação de p16 e HPV de alto risco oncogênico positivos, simultaneamente, em pacientes com citologia negativa ou com NIC 1, podem ser considerados um fator preditor de risco para transformação neoplásica.

Valasoulis *et al*⁷¹ avaliaram simultaneamente a tipagem de HPV, HPV de alto risco oncogênico, tipagem de HPV 16/18, mRNA E6 e E7 e p16 e concluíram que a positividade destes marcadores aumenta linearmente com a severidade da doença e que os mesmos poderiam ser úteis na predição do grau da NIC e das mulheres que realmente necessitariam de tratamento.

Mills *et al*⁷⁷ avaliaram simultaneamente o uso de p16, DNA-HPV 16 e antecedente clínico de citologia com NIC-AG e estratificou o risco para progressão da NIC 1. Sozinho o p16 não foi capaz de prever o risco evolutivo, entretanto quando os 3 marcadores eram positivos simultaneamente a chance de progressão passava de 7 para 36%.

Estudos posteriores poderão, de fato, validar este Escore de Risco e talvez modificar as estratégias de manejo da NIC-AG.

6 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados acima expostos, concluem os autores ser o p16 um marcador biológico capaz de identificar a severidade da neoplasia intraepitelial cervical de alto grau, uma vez que sua expressão foi percentualmente maior nos casos de NIC 3 em relação aos casos de NIC 2.

Embora sem significância estatística, a análise da superexpressão do p16 pode auxiliar nas discordâncias diagnósticas entre NIC 2 e 3, uma vez que sua análise quantitativa evidenciou maior percentual de positividade difusa e multifocal intensa nos casos de NIC3, enquanto os casos de NIC 2 denotaram um maior percentual de positividade multifocal leve ou ausente, mas um número maior de casos parece ser necessário para demonstrar um resultado estatístico relevante.

A expressão do p16 não foi capaz de prever a recorrência da NIC-AG tratada, mas denota uma tendência para evidenciar clinicamente a severidade da doença e, conseqüentemente seu risco de progressão, uma vez que sua superexpressão foi mais frequente nos casos de NIC 3 que de NIC 2 e pelo seu alto valor preditivo negativo.

A expressão do p16 evidencia forte relação com a infecção por HPV's de alto risco oncogênico, embora não tenha demonstrado um padrão específico de superexpressão relacionada a um sorotipo específico de HPV de alto risco oncogênico.

Não houve diferença estatística entre a expressão do p16 nos casos com margens positivas e margens negativas do produto de conização.

Isoladamente, o p16 não apresentou correlação de sua superexpressão com os fatores clínicos prognósticos de recorrência, mas sua aplicabilidade na análise conjunta com os fatores clínicos prognósticos de recorrência, como evidenciado no Escore de Risco produzido por esta pesquisa, torna-o capaz de estabelecer o risco de recorrência da doença cervical tratada.

REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health organization. International Agency for research on Cancer. Globocan2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/> Acesso em 17.mai.2016.
2. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2014. Acesso em 17.maio.2016.
3. Nadais RF, Campaner AB, Santos RE, Aoki T. Taxas de doença residual e de recidiva de neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau após tratamento por cirurgia de alta frequência. Rev Bras Genitoscopia. 2008; 2(3): 16-21.
4. Frazer I. Correlating immunity with protection for HPV infection. Inter. Journal of Infectious Disease. 2007; 11(supplement2): S10 -S16. Available from <http://intl.elsevierhealth.com/journal/ijid>.
5. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. Int J Gynecol Pathol. 1993; 12(2):186-92.
6. IARC. International Agency for Research on Cancer Monographs of evaluation of carcinogenetic risks to humans. Lyon, France. 1995; 49: 1409-1995. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 02.jul.2009.
7. Wright Jr TC, Massad S, Dunton JC, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon DD .2006 Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. AJOG, 2007, October: 340-345, Available from: www.AJOG.org. Acesso em 08.set.2009.
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV *et al*. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol. 1999; 189(1):12-9.
9. Villa LL. Human Papillomaviruses and cervical cancer. Adv Cancer Res. 1997; 71: 321-41.
10. Termini L, Villa LL. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. J Bras Doenças Sex transm. 2008; 20 (2): 125-31.
11. Tsoumpou I, Arbyn M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Malamou-Mitsi V, Paraskevaidis E. p 16 INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. Cancer Treat Review. 2009; 35: 210-220.

12. Torres RGA, Auler AMBA, Gianini RJ, Sampaio Neto LF, Mauad LMQ. Correlação dos aspectos comportamentais e epidemiológicos entre mulheres com câncer do colo do útero e mulheres com colpocitologia oncótica negativa. *Rev. Bras. Genitoscopia*. 2007; 1(4): 5-9.
13. Silva TT. Fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical em pacientes submetidas à avaliação morfológica e pesquisa de DNA-HPV [dissertação de mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2004.
14. Fialho SCAV, Almeida G, Do Val I, Vespa Jr N, Campaner AB. Neoplasia Intraepitelial Cervical. *J bras Doenças Sex Transm*. 2009; 21(4):166-70.
15. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powel K, Clayton L, Jay N, *et al*. The natural history of Human Papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*. 1998; 132(2): 277-84.
16. Campaner AB, Santos RE, Galvão MAL. Importância do tabagismo na carcinogênese do colo uterino. *Femina*. 2007; 35(11): 713-17.
17. Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science*. 1991; 254(5035): 1167-73.
18. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Can Inst*. 2000; 92 (9):690-8.
19. Muñoz N, Bosch FX. HPV and cervical neoplasia: review of case-control and cohort studies. *IARC Sci Publ*. 1992; (119): 251- 61.
20. WHO. Cervical Cancer. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/en>. Acesso em 09.jul.2011.
21. Lima MIM, Lodi CTC, De Lima SA, Lucena AAS, Guimarães MVMB, Meira HRC *et al*. Conização com cirurgia de alta frequência na neoplasia intraepitelial cervical: quando usar a alça de canal?. *Femina*. 2011Abr; 39(4): 183-88.
22. McAllum B, Sykes PH, Sadler L *et al*. Is the treatment of CIN 2 always necessary in women under 25 years old?. *Am Gynecol*. 2011Nov; 205(5): 478.e1-7.
23. Sarian LO, Derchain SFM, Bastos JFB. Métodos diagnósticos para o rastreamento do câncer de colo [editorial]. *RBGO*. 2010; 32(8): 363-7.
24. WHO. Effective screening programmes for cervical cancer in low and middle income developing countries. Internet. Disponível: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 02.jul.2009.

25. Nomelini RS, Barcelos ACM, Michelin MA, Adad SJ, Murta EFC. Prevenção do câncer de colo uterino: testes biomoleculares para HPV. *Femina*. 2007; 35(5): 295-99.
26. Ekalaksananan T, Pientog C, Sriamporn S, Kongyngyoes B, Pengsa P, Kleebkaow P *et al*. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol*. 2006; 103(1):62-6.
27. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(7):2407-14.
28. O'Neill CJ, McCluggage WG. P16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol*. 2006; 13(1): 8-15.
29. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D *et al*. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia.
30. Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, *et al*. The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia: predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol*. 2007; 104: 207-11.
31. Moutinho JAF *et al*. Consenso sobre Infecção por HPV e Lesões Intraepiteliais do colo, vagina e vulva. Coimbra 2014. Disponível em: <http://www.spGINECOLOGIA.pt/uploads/livro-de-consenso-prova-3-final.pdf>. Acesso em 06.dez.2015.
32. Altobelli A, Lattanzi A. Cervical carcinoma in the European union: an update on disease burden, screening program state activation, and coverage as of march 2014. *Int J Gynecol Cancer*. 2015 Mar; 25(3):474-83.
33. Strander B *et al*. Effect of ageing on cervical or vaginal cancer in Swedish women previously treated for cervical intraepithelial neoplasia grade 3: population based cohort study of long term incidence and mortality. *BMJ*. 2014Jan; 348:f7361.
34. Arbyn M *et al*. Long term outcomes for women treated for cervical precancer. *BMJ*. 2014Jan; 348:f7700.
35. Ramos MC, Pizarro de Lorenzo BH, Michelin MA, Murta EF. High grade cervical intraepithelial neoplasia, human papillomavirus and factors connected

- with recurrence following surgical treatment. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2008; 35(4):24-27.
36. Jin J, Li L, Zhang F. Metaanalysis of High Risk factors of residue or relapse of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015 AprJun; 29(2):4518.
 37. Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol*. 2000; 79(2):294-9.
 38. Baloglu A, Uysal D, Bezircioglu I, Bicer M, Inci A. Residual and recurrent disease rates following LEEP treatment in high-grade Cervical intraepithelial lesions. *Arch Gynecol Obstet*. 2010; 282: 69-73.
 39. Lubrano A, Medina N, Benito V, Arencibia O, Falcón JM, Leon L *et al*. Follow-up afeter LLETZ: a study of 682 cases of CIN 2- CIN 3 in a single institution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012; 161:71-4.
 40. Lima MI, Tafuri A, Araújo AC, Lima LM, Melo VH. Cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization in HIV-positive and HIV-negative women. *Inter J Gynaecol Obstet*. 2009; 104(2):100-4.
 41. Acladious NN, Sutton C, Mandal D, Hopkins R, Zaklama M, Kitchener H. Persistant human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer*. 2002; 98(3):435-9.
 42. Park JY, Lee KH, Dong SM, Kang S, Park SY, Seo SS. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol*. 2008; 108(3):549-54.
 43. Prato B, Ghelardi A, Gadducci A, Marchetti I, Di Cristofano C, Di Coscio G *et al*. Correlation of recurrence rates and times with posttreatment human papillomavirus status in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Cancer*. 2008; 18: 90-4.
 44. Flannelly G, Bolger B, Fawzi H, De Lopes AB, Monaghan LM. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? *BJOG*. 2001; 108(10):1025-1030.

45. Maluf PJ, Adad SJ, Murta EF. Outcome after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III: relation with surgical margins, extension to crypts and mitoses. *Tumori*. 2004; 90(5):473-7.
46. Ghaem-Maghani S, De-Silva D, Tipples M, Lam S, Perryman K, Soutter W. Determinants of success in treating cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG*. 2011May; 118(6):679-84.
47. Lodi CT, Michelin MA, Lima MI, Teixeira NC, Adad SJ, Murta EF *et al*. Factors associated with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization in HIV-infected and noninfected women. *Arch Gynecol Obstet*. 2011 Jul; 284(10):191-7.
48. Malapati R, Chaparala S, Cejtin HE. Factors influencing persistence or recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure. *J Low Genit Tract Dis*. 2011 Jul; 15(3):177-9.
49. Woo YL, Badley C, Jackson E, Crawford R. Long-term cytological and histological outcomes in women managed with loop excision treatment under local anaesthetic for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cytopathology*. 2011Oct; 22(5):334-9.
50. Serati M, Siesto G, Carollo S, Formenti G, Riva C, Cromi A, Ghezzi F. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization: a 10-year study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012Nov; 165(1):86-90.
51. De Mello Silva MV, Coutinho IC, De Andrade Heráclio S, Fittipaldi HM, Katz L. Factors associated with the persistence/ recurrence of CIN 2/3 in women submitted to loop electrosurgical excision procedure in a teaching hospital in northeastern Brazil: a case-control study. *J Low genit Tract Dis*. 2014Oct; 18(4):286-90.
52. van Bogaert U. Involved LEEP excision margin as predictor of residual/ recurrence disease in HIVpositive and HIVnegative women in a low-resource setting. *Anal Quant Cytopathol Histpathol*. 2015 Apr; 37(2):105-8.
53. Russomano F, Reis A, Camargo MJ, Grinszlejn B, Tristão MA. Recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 or 3 in HIV-infected women treated by large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *Sao Paulo Med J*. 2008; 126 (1):17-22.
54. Pantanowitz L. Treatment failure and recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. *Women's Health*. 2010; 6(6): 781-3.

55. Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, Herrero J, Vimercati A, Putignano G. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Aug1; 121(2):226-32.
56. Russomano F, Paz BR, Camargo MJ, Grinstenj BG, Friedman RK, Tristão Ma *et al.* Recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency vírus infected women treated by means of electrosurgical excision of the transformation zone (LLETZ) in Rio de Janeiro, Brazil. *Sao Paulo Med J.* 2013; 131(6):405-10.
57. Oliveira CA, Russomano FB, Gomes Júnior SCS, Correa FM. Risk of persistent high-grade squamous intraepithelial lesion after electrosurgical excisional treatment with positive margins: a meta-analysis. *Sao Paulo Med J.* 2012; 130(20):119-25.
58. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Concepcion Bratti M, Wright T, Rodrigues AC, Chen S, Reichert A *et al.* Validation of p16 INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a Population-Based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13(8): 1355-60.
59. Liao GD, Sellors JW, Sun HK, Zhang X, Bao YP, Jeronimo J *at al.* P16INK4A immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: a prospective study in China. *Int J Cancer.* 2014 Apr 1; 134(7):1715-24.
60. Da Costa LB, Triglia R de M, França Junior MC, Andrade LA. P16(INK4A) expression as a potencial marker of low-grade cervical intraepithelial neoplasia progression. *APMIS.* 2015 Mar; 123(3):185-9.
61. Fonseca FV, Tomasich FDS, Jung JE, Maestri CA, Carvahó NS. The role of p16 INK4a and p53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment. *Rev Col Bras Cir.* 2016;43(1):035-041.
62. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D *et al.* Overexpression of p16INK4A as a especific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001; 92: 276-84.
63. Jung JE, Anselmi Jr R, Gennaro L, Leme FEG, Martins APF, Hirth CG *et al.* Immunohistochemical assessment of E-cadherin, B-catenin, CEACAM-1 and

- PTEN: tumor progression markers in melanoma. *J Bras Patol Med Lab.* 2010; 46(2). Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442010000200007>. Acesso em 09.jul.2011.
64. Syrjanen K, Kataja V, Yliskoski M, Chang F, Syrjanen S, Saarikoski S. Natural history of cervical human papillomavirus lesions does not substantiate the biologic relevance of the Bethesda System. *Obstet Gynecol.* 1992May; 79(5(Pt1)):675-82.
 65. Loffredo D'Ottaviano MG, Discacciatti MG, Andreoli MA, Costa MC, Termini L, Rabelo-Santos SH *et al.* HPV 16 is related to the progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2: a case series. *Obst Gynecol Inter.* 2013: 1-5.
 66. Keating JT, Cviko A, Reithdorf S, Reithdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K and Crum CP. Ki-67, cyclin E, and p16^{INK4} are complimentary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(7):884-91.
 67. Queiroz C, Silva TC, Alves VAF, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Araújo Filho JB, Studart E, Cheto T and De Freitas LAR. p16^{INK4a} expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006; 202(2):77-83.
 68. Bragança JF, Sarian LO, Pitta DR, Maito AB, Vassalo J, Pignataro F, Andrade LA and Derchain S. Expression of p16 INK4a and cervical infection with high-risk human papillomaviruses are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2008; 18(5):1060-4.
 69. Demir F, Kimiloglu E, Igdem AA, Ayanoglu YT, Erdogan N. High risk HPV in situ hybridization, p16INK4A, and surviving expressions in cervical carcinomas and intraepithelial neoplasmsÇ evaluation of prognostic factors. *Eur J gynaecol Oncol.* 2014; 35(6):708-17.
 70. Krishnappa P, Mohamad IB, Lin YJ, Barua A. Expression of p16 in high-risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia. *Diagn Pathol.* 2014; 9:202.
 71. Valasoulis G, Stasinou SM, Nasioutziki M, Athanasiou A, Zografou M, Spathis A *et al.* Expression of HPV-related biomarkers and grade of cervical intraepithelial lesion at treatment. 2014 Feb; 93(2):194-200.

72. Chang MS, Oh S, Jung EJ, Park JH, Jeon HW, Lee TS *et al.* High-risk human papillomavirus load and biomarkers in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. 2014 May; 122(5):427-36.
73. Alshenawy HA. Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesion: potential utility in diagnosis and prognosis. *Pathol Res Pract.* 2014 Dec; 210(12):916-21.
74. Calil LN, Edelweiss MI, Meurer L, Igansi CN, Bozzetti MC. P16INK4A and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. *Pathol Res Pract.* 2014 Aug; 210(8):482-7.
75. Guerra F, Rocher AE, Hidalgo JV, Diaz L, Vighi S, Cardinal S, Tatti S, Cúneo N, Gay GP, Camporeale G and Palaoro LA. Argentophilic nucleolus organizer region as a proliferation marker in cervical intraepithelial neoplasia grade 1 of the cervix. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014; Jun 40(6): 1717-1724.
- 76.** Zhang G, Yang B, Abdul-Karim FW. P16 immunohistochemistry is useful in confirming high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing. *Int J Gynecol Pathol.* 2015 Mar; 34(2):180-6.
77. Mills AM, Paquette C, Castle PE, Stoler MH. Risk stratification by p16 immunostaining of CIN 1 biopsies: a retrospective study of patients from de quadrivalent HPV vaccine trials. *Am J Surg Pathol.* 2015 May; 39(5):611-7.
- 78.** Motamed M, Bohmer G, Neumann HH, von Wasielewski R. CIN III lesions and regression: retrospective analysis of 635 cases. *BMC Infect Dis.* 2015;15:541.

ANEXOS

1. Ficha de coleta de dados

1- Identificação:

2- Registro (prontuário):

3- Idade:

4- Soropositividade para HIV:

5- Método Anticoncepcional:

6- Tabagismo: () SIM () NÃO

7- Histologia do produto do CONE:

() NIC1 () NIC2 () NIC3

8- Sub-tipo de HPV: nº _____

9- Imunorreação:

9.1- () positivo () negativo

9.2- () + forte () +fraco () negativo

9.3- () difuso () multifocal intenso () multifocal leve () negativo

9.4- () núcleo () citoplasma () citoplasma+ núcleo

10- Recidiva: ()sim ()Não



PARECER CONSUBSTANCIADO

No dia 06 de dezembro de 2011, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, avaliou o projeto intitulado como: "Correlação do imunomarcador p16(ink4a) com a o grau de severidade da neoplasia intra-epitelial cervical e com o tipo de hpv presente", cujo número de protocolo é P.P.2147, cujo pesquisador principal é **Fernanda Villar Fonseca**

Tendo o seguinte parecer:

OBJETIVO GERAL: O câncer de colo de útero é a segunda neoplasia mais freqüente na mulher, no mundo com alta morbi-mortalidade, porem com alto potencial de prevenção se descoberto e adequadamente tratado na forma da neoplasia intra-epiteliais. A busca de marcadores biológicos com alto poder preditivo pode aprimorar sua capacidade de identificação e tratamento, diminuindo sua evolução para carcinoma invasor.

SUMÁRIO DO PROJETO: Estudo transversal, das pacientes submetidas a conização por neoplasia intra-epitelial cervical, no período supra-citado, no serviço de Patologia Cervical do HEG, inicialmente fazendo a revisão das lamínas dos produtos de conização destas pacientes e aplicação de imunohistoquímica para p 16 em lamínas produzidas por técnica de tissue microarray nestes produtos de conização e posterior análise estatística dos dados, correlacionados a servidade da NIC com a possibilidade deste imunomarcador e correlacionando estes dados como tipo de HPV de cada paciente desta, trabalhando em parceria com o setor de imunogenética da UFPR.

PARECER: APROVADO

Atenciosamente

Coordenador do CEP
Dr. Jordan Zanetti Silva

Dr. Jordan Zanetti Silva
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa
13.0-L.P.C.G. - CFM-PR 14.457

Membros do CEP:

Aline R. Cruz de Souza - Bioquímica
André Leite de Moraes - Médico
Dinarte Orlandi - Estatístico
Elenice de Oliveira Santana - Enfermeira
Eliane Ricardo Machado - Enfermeira
Carlos Garçon Voluntária de Saúde Feminina
Jesoline Marie Nardin - Farmacêutica
Jordan Zanetti Silva - Médico
José Carlos Wiedersheim - Adv. da Empresa

Juliano Dugonski - Farmacêutico
Márcia Bobak - Enfermeira
Marina Lopes - Nutricionista
Paula B. Bettiga - Psicóloga
Patrícia Blasco Silva - Nutricionista
Priscilla L. Leite Silva - Farmacêutica
Priscilla F. Fabre - Psicóloga
Rosane de Azeite Johnson - Médica
Wanda Aparecida S. de Moraes - Membro da Comissão

3.1 ARTIGO PUBLICADO

O papel da expressão imunoistoquímica do P16INK4a e do P53 na predição da recorrência da nic-ag após tratamento por conização

The role of P16INK4a and P53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment

Fernanda Villar Fonseca; Flávio Daniel S. Tomasich; Juliana Elizabeth Jung; Carlos Afonso Maestri; Newton Sérgio de Carvalho 035

Rev Col Bras Cir 2016; 43(1)

Rev. Col. Bras. Cir. Rio de Janeiro Vol 43 Nº 1 p 001 / 069 jan/fev 2016.

3.2 ARTIGOS SUBMETIDOS

The role of HIV positive status as an independent factor for predicting the risk of recurrence of cervical HSIL

Institutions: Universidade Federal do Paraná – Curitiba (PR)/ Brazil and Hospital Erasto Gaertner, Curitiba (PR)/ Brazil

Fernanda Villar FONSECA¹

Newton Sérgio de CARVALHO².

Teresa Cristina CAVALCANTE³.

1. M.D, Gynecologist-Obstetrician and Colposcopy experience/ Gynecologic Oncology Department/ Erasto Gaertner Hospital.

2. PhD, Gynecologist-Obstetrician and Colposcopy experience/ Master-Chief by Gynecologic Department/ Professor in the Universidade Federal do Parana.

3. Ph.D, Pathologist/ Pathology Department/ Professor in the Universidade Federal do Paraná.

Short Summary

A study of cervical HSIL, treated by conization, and submitted to evaluation the role of HIV positive status for predicting the risk of recurrence and correlate these data with HPV sorotypes.

Address :

Fernanda Villar Fonseca- Hospital Erasto Gaertner, rua Doutor Ovande do Amaral, 201, Jardim América, Curitiba, Paraná – Brasil. CEP 81520-060.

e-mail : luifernascimento@terra.com.br

Contact: luifernascimento@terra.com.br or fone number: 55-41-91984902 or fax number: 55-41-30898888

Abstract: 249 words/ Text: 2498 words/ Figures: 1 / Tables: 4

Conflict of interest: the authors there are no conflict of interest and the research was totally paid by the authors and their institutions.

Abstract

Purpose: To evaluate the role of being HIV positive for predicting the risk of recurrence in women with a cervical HSIL diagnosis. **Methods:** A retrospective review was conducted of patients with known HIV and HPV status who had undergone conization due to cervical HSIL. The HIV+ group was compared with the HIV- group according to conization technique, margins status, and follow up. The characteristics of Antiretroviral Therapy (ART) and immunological status were studied. The recurrence rate and HPV types were evaluated in both groups. A chi-square test was used for statistical analysis and p-values were less than or equal to 0.05. **Results:** 262 women with cervical HSIL, 242 of whom with categorized by HIV status, between 19 to 48 years old (35 ± 6), were divided in two groups: 11 patients with HIV (case group) and 231

without HIV (control group). A total of 20% of all recurrence in the group as a whole occurred HIV positive women. The recurrence rate among HIV negative women was 8% (18/231) and the recurrence rate among HIV positive women was 45% (5/11) ($p=0.002$). Analyzing the margin status, in which margins were negative for disease, the recurrence rates were 5% in HIV negative women and 50% in HIV positive women ($p<0.001$). All HIV positive women with recurrence of HSIL, after conization, were positive for HPV 16.

Conclusion: HIV positive status is a significant factor related to recurrence of cervical HSIL, and in this condition the margin status is not considered a relevant for recurrence.

Key words: CIN, recurrence, HIV.

Authors: Fernanda V. Fonseca, Teresa C. Cavalcanti, Newton S. de Carvalho.

Institutions: Universidade Federal do Paraná, Hospital Erasto Gaertner/ Brazil.

INTRODUCTION

Despite constant advances, the HIV epidemic is still a major public health problem worldwide. Recent data show about 37 million people worldwide are living with the virus, with about 2 million new cases and 1.2 million deaths per year¹.

However, with improved information and accessibility, particularly in developing countries, there has been a significant increase in survival rates for these patients as a result of proper management and use of antiretroviral therapy (ART). Increased survival rates, however, have led to the need for managing chronic diseases, such as cancer and their precursors, in HIV positive patients^{1,2,3}.

In 1995 the World Health Organization (WHO) correlated coinfection of HIV / HPV with the highest incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer, showing that women with HIV were more likely to have multiple types of, and persistent, HPV infections, and consequently an increased risk of invasive cervical cancer⁴.

Cervical cancer appears to be one of the most frequent malignancies in women with AIDS⁵. In 1993, invasive cervical cancer was identified in carriers of the HIV virus, defining an AIDS diagnosis, and this raised the question of whether their HIV status increased their cervical cancer risk⁵.

Knowledge of risk factors for the persistence of HPV infection or persistent / recurrent CIN is essential for early detection, and thus for the prevention of cervical cancer. Age, parity, injury degree, HIV positive status, viral serotype HPV, margin status, and glandular extension have been described as possible risk factors^{4,6}.

There is always a possibility of persistence / recurrence of cervical intraepithelial neoplasia, regardless of therapeutic choices. However, the prediction of recurrence and risk factors involved allows closer monitoring of patients at higher risk and greater intervention, with the goal of preventing invasive cancer⁷.

Within this context, this study aims to identify the clinical significance of HIV seropositivity as a single prognostic factor in predicting the recurrence of HSIL (High Squamous Intraepithelial Lesion) treated with conization, by using of the low voltage diathermy handle technique (Loop Electrosurgical Excision Procedure- LEEP), and its correlation with the type of HPV and the compromised margins in the conization product.

OBJECTIVES

Analyze the clinical and statistical significance of HIV seropositivity in women diagnosed with CIN 2 and 3 (HSIL) of the cervix, undergoing treatment for conization using the low voltage diathermy handle technique (LEEP) in order to identify the risk of persistence / recurrence of the disease.

Correlate the risk of recurrence for women with HIV seropositivity who use antiretroviral therapy (ART), through observing the CD4 count and the HPV serotype present in these patients.

METHODS

A cross-sectional study was conducted.

The population involved in the study included patients with a histological diagnosis of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/ 3) after conical resection, performed at the Erasto Gaertner Hospital (Hospital Erasto Gaertner, HEG) in Curitiba, southern Brazil, from January 2009 to August 2011, using the LEEP technique and previously known HPV serotypes. The epidemiological and histopathological data of the surgical specimen were correlated to the evolution of the patients, and assessed for their ability to predict disease recurrence.

The patient sample was divided into two groups:

- CASE GROUP: HIV positive women with a diagnosis of HSIL, after treatment by LEEP conization, with a minimum follow-up of 18 months);
- CONTROL GROUP: HIV negative women with a diagnosis of HSIL, after treatment by LEEP conization, with a minimum follow-up of 18 months.

Sample selection:

Inclusion criteria: Women at the HEG Low Genital Tract Disease (Cervical Pathology Service), between 19 and 48 years old, who had undergone cervical cytology, colposcopy, and biopsy proving HSIL (CIN 2/3); had been treated by conization surgery leading to identification of any degree of CIN in the histological product; and had received post-treatment clinical follow-up. The follow-up was considered adequate when it was performed via cytology, colposcopy, or biopsy if necessary at 6-month intervals, for at least 18 months. These women were previously submitted to HPV genotyping, using a HPV genotyping test to HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 73, 82, 26, 59, 53, 66, and 68 (polymerase chain reaction, conventional technique).

Exclusion criteria: Insufficient clinical data in the medical records, post-conization follow-up time less than 18 months, patients who underwent a hysterectomy for benign disease, presence of invasive carcinoma in a biopsy or in the conization product, and no evidence of cervical intraepithelial neoplasia after microscopic evaluation of the histological product of conization.

All the patients analyzed, had a result CIN 2 or 3 in a cervical biopsy before the conization and the histological product of the conization showed a result of CIN between 2 and 3.

Recurrence of the disease was determined by the presence of CIN 1, 2, or 3 found through cervical cytology, colposcopy, and/or biopsy during the follow-up.

This study was properly approved by the Ethics Committee for Research of the HEG, under the protocol number 2147.

The collection of data on HIV seropositivity, the use of ART (antiretroviral therapy), and CD4 count was carried out in consultation with the histological diagnosis of HSIL prior to the surgery.

Among the 500 patients treated in the above-mentioned period, applying the exclusion criteria resulted in 262 eligible patients: 146 women diagnosed with CIN 2 and 116 diagnosed with CIN 3. Of this total, 250 were positive for HPV DNA and 12 were negative for HPV DNA (Figure 1).

Of the 262 patients, 242 were tested for HIV 1 and 2 by enzyme immunoassay ELISA, with the positive cases confirmed by Western blot. The study design is shown in Figure 1 in accordance with Consort.

The testing of the HIV seropositivity of each patient was routine for this cervical pathology service, and the exam was authorized prior to execution by the patient's signed consent in the laboratory of the referred hospital.

The conization technique:

The conization surgery was performed using the LEEP technique: the loop electrosurgical excision procedure under local anesthesia, with the removal of two pieces, ectocervical and endocervical margins, marked in their margins with ink for later studies.

The histopathological analysis for the conization pieces:

The evaluation of the histological sections of the conization product of each patient was concentrated on the following queries: diagnosis, the glandular extension of either present or absent disease, and the presence or absence of residual disease on the margins of the product of conization. The evaluated material was the slides prepared and studied at the time of conization, following the standard criteria of the pathological anatomy service of the referred hospital and revised at the time of this study. These histological sections were prepared by the conventional technique of haematoxylin eosin stain.

At the specimen of conization, the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia was confirmed again. In some cases, there was a divergence in the result of the previous biopsy, and the surgical specimens could be classified as CIN 1 (when the histological alteration was restricted to the lower third of the epithelium), CIN 2 (when the histological alteration occupied the basal two-thirds of the epithelium), or CIN 3 (when the histological alteration occupied all of the extension of the epithelium).

HPV genotyping results:

All women were previously submitted to a HPV Genotyping Test, including 18 types of HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 73, 82, 26, 59, 53, 66, and 68), and they were from a Database of Genetics Department of UFPR/ Brazil.

Statisticals analysis:

A rigorous statistics analysis of the data was conducted using the SPSS 19.0 program/IBM, searching for a Confidence Interval superior to 95% and a significance level of 5%.

RESULTS

This research included 231 patients seronegative for HIV (95%) and 11 patients seropositive for HIV (5 %).

Among the HIV positive patients, 7 were users of ART, 1 had a CD4 count lower than 200, 5 had CD4 counts between 200 and 500, 3 had CD4 counts higher than 500, and 2 were unaware of the value of their CD4.

Comparative epidemiological data between the two groups can be seen in Table 1.

Of the 262 treated patients, there were 25 cases of recurrence (overall recurrence rate of 9.5%).

Among the 25 recurrences, 20% (5/25) were HIV positive, with $p = 0.002$.

Among the 5 HIV positive women who had recurrences, all were carriers of HPV DNA 16, but among HIV positive women who did not have recurrences, only 67% were HPV DNA 16 ($p = 0.45$).

Among the 7 seropositive women using ART, 4 had recurrences (recurrence rate of 57 %) compared to only 1 woman with recurrence who did not use ART (25% recurrence rate).

Recurrence rates related to CD4 count can be seen in Table 2.

Histological margins of conization product were compromised in 12% of patients (31/262 patients), and of these 31 cases, 15 cases had only impaired ectocervical margin, 15 cases only impaired endocervical margin, and 1 case had both margins compromised simultaneously. The margins were free of recurrence in 88% of cases (231/262 cases).

Excluding those with positive margins, there were 231 patients with free margins in conization, and of the 212 women with known HIV status, 96 % (204) were seronegative and 4 % (8) were seropositive.

In this subgroup of women with free margins and known HIV status, the recurrence rate was 5% (10/204) in seronegative women for HIV and 50% (4/8) in seropositive women for HIV ($p < 0.001$), as can be seen in table 3.

DISCUSSION

In our population, the adherence to post-treatment follow-up protocols for HSIL is still very low, and the persistent indices and / or recurrence of the disease are high. We surveyed many factors in order to identify women at higher risk for recurrence, trying to optimize the socio-economic cost of follow-up, without increasing the risk of progression to cancer.

Many studies correlate HIV seropositivity with a higher risk of therapy failure of HSIL⁸⁻¹⁹ in accordance with the data produced in this analysis. Others, however, go further, demonstrating the correlation between HIV seropositivity and risk of progression to cervical cancer^{3,18,20}.

Analyzing the immune status of patients, there seems to be a direct correlation between CD4 count and the risk of residual disease and recurrence^{13,18,21-23}. Heard²¹ argues that a CD4 count lower than 200 and involved margins of conization product would be significant risk factors for recurrence, and the use of ART a strong protective factor. As Heard²¹ notes, the data produced in this analysis, although not showing statistical significance, show a correlation tendency between the immune status of HIV positive women and the risk of recurrence.

There seems to be an increased risk of 4 to 5 times for HSIL to persist despite treatment in HIV positive women, and their immune status may decrease the time before recurrence occurs or progresses^{17,18}.

Although the data produced here have not shown a correlation between HIV seropositivity and the commitment of the conization product margins, there were twice as many positive margins in seropositive women compared to seronegative women.

It was also observed in this study that when margins are compromised, the chance of recurrence is similar between seropositive women and seronegative women, but when margins are free, the risk of

recurrence is much higher in HIV positive women, suggesting that HIV positive patients, even those with free margins, should have rigorous and differentiated follow-up.

Some studies directly correlate the compromised margin of conization product and seropositivity for HIV as independent factors for recurrence and / or persistence of cervical disease^{11-14,21,24}. Some studies have shown that HIV seropositivity in women with HSIL increases the chance of multiple procedures for the control of cervical disease, and the appropriate management of margins and the immune status of the patient decrease the risk of persistence and / or progression^{11-13, 20,24 to 26}.

Statistically it was not possible to correlate the infection by HPV 16 and the number of serotypes present in each sample with the risk of recurrence, but clinically there is a higher prevalence of HPV 16 in seropositive patients with recurrence than in other patients. There is a higher prevalence of HPV DNA of multiple types in seropositive, which should be investigated in further studies.

Correlating several studies disclosed here, it may be noted that the recurrence of HSIL in HIV positive women is often higher than in HIV negative women, as can be seen in the time series shown in Table 4.

A limitation of this research is that we studied a small number of HIV positive patients, given that the criteria for inclusion and exclusion of this study, eliminated a large percentage of patients. However, our findings were significant what was intended to study, which was the relationship between seropositivity and the risk of disease recurrence. Their relationship between a more prevalent HPV serotype and a woman's immune status was not statistically significant; it only showed a trend.

After careful analysis of all these data, it was concluded that seropositivity for HIV is an independent risk factor for recurrence of HSIL examined though LEEP, since excluding the positive margins as confounders, seropositivity HIV remained a statistically significant factor in the recurrence of CIN 2/3.

REFERENCES

1. UNAIDS. GLOBAL AIDS Response Progress Reporting 2015. Available at: <http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/HowAIDSchangedeverything/factsheet>. Accessed Nov22, 2015.
2. Palella Jr, FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA et al . Declining Morbidity and Mortality among patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. N Engl J Med. 1998; 338:853-60.
3. Russomano F, Reis A, Camargo MJ, Grinszlejn B, Tristão MA. Recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 or 3 in HIV-infected women treated by large loop excision of the transformation zone (LLETZ). Sao Paulo Med J. 2008; 126(1):17-22.
4. IARC. International Agency for research on Cancer Monographs of evaluation of carcinogenetic risks to humans. Lyon, France. 1995; 49:1409-1995. Available at: <http://www.who.int/en/>. Accessed Jul02.Jul, 2009.
5. Leitão Jr MM, White P, Cracchiolo B. Cervical cancer in patients infected with the Human Immunodeficiency Virus. Cancer. 2008; 112:2683-9.

6. Park JY, Lee KH, Dong SM *et al.* The association of pre conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol.* 2008; 108(3):549-54.
7. Ghaem Maghami S, Sagi S, Majeed G, Soutter WP. Incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia and risk of treatment failure a metaanalysis. *Lancet Oncol.* 2007Nov; 8(11):985-93.
8. Chirenje ZM, Rusakaniko S, Akino V, Munjoma M, Milingo M. Effect of HIV Disease in Treatment of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions among Zimbabwean women. *J Low Genit Tract Dis.* 2003Jan; 7(1):16-21.
9. Tebeu PM, Major AL, Mhawech P, Rapiti E. The recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in HIV positive women: a review of literature. *Int J STD AIDS.* 2006Aug; 17(8):507-11.
10. Massad LS, Fazzari MJ, Anastos K, Klein RS, Minkoff H, Jamieson DJ *et al.* Outcomes after treatment of cervical intraepithelial neoplasia among women with HIV. *J Low Genit tract Dis.* 2007Apr; 11(2):90-7.
11. Adam Y, van Gelderen CJ, Bruyn G *et al.* Predictors of persistent cytologic abnormalities after treatment of cervical intraepithelial neoplasia in Soweto, South Africa: a cohort study in a HIV high prevalence population. *BMC Cancer.* 2008. 8: 211 doi: 10.1186/1471-2407-8-211.
12. Ramos MC, Pizarro de Lorenzo BH, Michelin MA, Murta EF. Highgrade cervical intraepithelial neoplasia, human papillomavirus and factors connected with recurrence following surgical treatment. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2008; 35(4):24-27.
13. Lima MI, Tafuri A, Araújo AC, Lima LM, Melo VH. Cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization in HIV-positive and HIV-negative women. *Inter J Gynaecol Obstet.* 2009; 104(2):100-4.
14. Malapati R, Chaparala S, Cejtin HE. Factors influencing persistence or recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure. *J Low Genit Tract Dis.* 2011 Jul; 15(3):177-9.
15. Lodi CT, Michelin MA, Lima MI, Teixeira NC, Adad SJ, Murta EF *et al.* Factors associated with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization in HIV-infected and noninfected women. *Arch Gynecol Obstet.* 2011 Jul; 284(10):191-7.
16. Zeier MD, Nachega JB, Van Der Merwe FH, EshunWilson I, Van Schalkwyk M, La grange M *et al.* Impact of timing of antiretroviral therapy initiation on survival of cervical squamous intraepithelial lesions: a cohort analysis from south Africa. *Int J STD AIDS.* 2012 Dec; 23(12):89-06.
17. Russomano F, Paz BR, Camargo MJ, Grinstenj BG, Friedman RK, Tristão Ma *et al.* Recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus infected women treated by means of electrosurgical excision of the transformation zone (LLETZ) in Rio de Janeiro, Brazil. *Sap Paulo Med J.* 2013; 131(6):405-10.
18. Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, Herrero J, Vimercati A, Putignano G. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Aug1; 121(2):226-32.
19. Bambury I, Mullings A, Fletcher H, Johnson N, Tolluch Reid M. Cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of HIV positive women at the University of the West Indies: management and outcome. *West Indian Med J.* 2013; 62(4):31-37.

20. Huchko MJ, Leslie H, Maloba M, Zakaras J, Bukusi E, Cohen CR. Outcomes Up to 12 months after treatment with Loop Electrosurgical Excision procedure for cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015 Jun1; 69(2):200-5.
21. Heard I, Potard V, Foulot H, Chapron C, Costagliola D, Kazatchkine MD. High rate of recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after surgery in HIV-positive women. *J Acquir Immune defic syndr*. 2005 Aug1; 39(4):412-18.
22. Lehtovirta P, Paavonen J, Heikinheimo O. Risk factors, diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia among HIVinfected women. *Int J STD AIDS*. 2008 Jan; 19(1):37-41.
23. Huchko MJ, Leslie H, Maloba M, Bukusi EA, Cohen CR. Factors associated with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia 2+ after treatment among HIVinfected women in Western Kenya. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014 Jun1; 66(2):188-92.
24. van Bogaert U. Involved LEEP excision margin as predictor of residual/ recurrence disease in HIVpositive and HIVnegative women in a low-resource setting. *Anal Quant Cytopathol Histpathol*. 2015 Apr; 37(2):105-8.
25. Foulot H, Heard I, Potard V, Costagliola D, Chapron C. Surgical management of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008 Dec; 141(2): 153-7.
26. Reimers LL, Sotardi S, Daniel D *et al*. Treatment failure and recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. *Women`s Health*. 2010; 6(6):781-3.

FIGURES

Figure 1 - Study design (in according with Consort).

TABLES

VARIABLE	HIV NEGATIVE WOMEN	HIV POSITIVE WOMEN	p VALUE
Age	35±6 (CI95%: 34-36) MIN 19 MAX 48	34±4 (CI95%: 31-36) MIN 29 MAX 48	
Histological conization product	CIN2= 125 (54%) CIN3= 106 (46%)	CIN2= 7 (64%) CIN3= 4 (36%)	p= 0.73
Presence multiple HPV-DNA	32% (70/222)	55% (6/11)	p= 0.27
HPV-DNA 16 positive	63% (146/231)	82% (9/11)	p= 0.33
Compromised margins in histological product	12% (27/231)	27% (3/11)	p= 0.14
Recurrence rate	8% (18/231)	45% (5/11)	p= 0.002

Table 1 - Available data among HIV positive and HIV negative women, with HSIL and submitted to LEEP conization.

CD4 COUNTS	n PACIENTS	n RECURRENCE	RECURRENCE RATE
< 200	01	01	100%
200 - 500	05	02	40%
> 500	03	01	33%

Table 2 - CD4 counts and the correlation with the recurrence rate of HSIL in HIV positive women treated by LEEP conization.

CONIZATION MARGINS STATUS	HIV NEGATIVE WOMEN	HIV POSITIVE WOMEN	p VALUE
Recurrence rate in free margins	5% (10/204)	50% (4/8)	<u>p=0.001</u>
Recurrence rate in compromised margins	30% (8/27)	33% (1/3)	p=1.0

Table 3 - Recurrence rate in HIV positive and HIV negative women correlated with the status of conization margins on histological product.

AUTHOR	PUBLICATION YEAR	n AVAILABLE	n HIV POSITIVE WOMEN	SURGICAL TECHNIQUE	RECURRENCE RATE
Lima MI <i>et al</i>	2008	201	94	LEEP	33%
Reimers LL <i>et al</i>	2010	136	136	LEEP/CONE	50%
Bambury I <i>et al</i>	2013	42	15	LEEP	19%
Huchko MJ <i>et al</i>	2014	297	297	LEEP	7.1%
Van Bogaert LI <i>et al</i>	2015	176	72	LEEP	72%
Huchko MI <i>et al</i>	2015	284	284	LEEP	13%
Fonseca FV <i>et al</i>	actual	262	11	LEEP	45%

Table 4 – Recurrence rate of HSIL, treated by conization, in HIV positive women, between authors.

PROGNOSTIC FACTORS RELATED TO RECURRENCE AFTER CONIZATION DUE TO HIGH GRADE CERVICAL INTRAEPITELIAL NEOPLASIA

Institutions: Universidade Federal do Paraná – Curitiba (PR)/ Brazil and Hospital Erasto Gaertner Cancer Center , Curitiba (PR)/ Brazil

Fernanda Villar Fonseca¹

Newton Sérgio de Carvalho².

Teresa Cristina Cavalcante³.

1. M.D, Gynecologist-Obstetrician and Colposcopy experience / Gynecologic Oncology Department/ Lower Genital Tract Diseases Sector / Erasto Gaertner Cancer Center Hospital;

2. M.D. Ph.D, Gynecologist-Obstetrician and Colposcopy experience/ Full Professor of Gynecologic Department/ Master-chief of Gynecology and Obstetrics Department / Federal University of Parana (Professor in the Universidade Federal do Paraná);

3. M.D. Ph.D, Pathologist/ Professor of Pathology Department/ Federal University of Parana

Short Summary

A study on cervical HGSIL to evaluate the ability of various factors to predict recurrence or persistence disease, after therapeutic conization on CIN 2 and 3, treated by LEEP.

Address:

Fernanda Villar Fonseca- Hospital Erasto Gaertner, rua Doutor Ovande do Amaral, 201, Jardim América, Curitiba, Paraná – Brasil. CEP 81520-060.

e-mail: luifernascimento@terra.com.br

Contact: luifernascimento@terra.com.br or fone number: 55-41-91984902 or fax number: 55-41-30898888

Abstract: 247 words/ Text: 2684 words/ Figures: 1/ Tables: 6

Conflict of interest: the authors there are no conflict of interest and the research was totally paid by the authors and their institutions.

SUMMARY

To evaluate the capacity of various factors to predict recurrence or persistence disease, after therapeutic conization on CIN 2 and 3, treated by LEEP. **Methods:** A cross-sectional review was conducted in patients who had undergone conization by LEEP technique, due to CIN 2 and 3, from January 2009 to August 2011 at Erasto Gaertner Cancer Center Hospital, Brazil. The group with and without recurrence was compared and univariate and multivariate analysis were used to define the predictive factors of recurrence. Chi Square test was used for statistical analysis and the p value was less than or equal 0.05 and Relative Risk (RR) calculated. **Results:** 262 women, between 19 to 48 years old (35 ± 7), divided in two groups: 25 patients with recurrence of CIN (case group) and 237 without recurrence of the disease (control group). This first group was compared with the data of only margins free cases to excluded factor of confusion. Recurrence rate was 9.5%. Only HIV-positive (Recurrence rate 50% x 8%, $p = 0.00$ / $RR = 12$), DNA-HPV 16 (Recurrence rate 13% x 4%, $p = 0.02$ / $RR = 4$) and compromised margins (Recurrence rate 33% x 6.5%, $p = 0.00$ / $RR = 16$) were predictors of recurrence ($p < 0.05$). The RR to recurrence in women with all the 3 factors together was 25. **Conclusion:** the recurrence of CIN 2 and 3 was statistically related to compromised margin of the conization product, detection of DNA-HPV 16 and the HIV-positivity. These factors in this sample can be considered risk factors for recurrence from CIN after conization.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia, conization, recurrence.

INTRODUCTION

The cervix cancer is the second most common type of cancer in females worldwide. It is responsible for the death of till 270.000 women every year and about 85% of the cases occur in underdeveloped countries¹. This type of cancer still remains as one of the biggest problems in public health in underdeveloped and developing countries, especially in Latin America and the Caribbean¹. Despite this disease can be preventable, the cooperative efforts, in a global way, to implement tracking programs, haven't still reduced successfully the deaths from this disease, mainly in the Americas¹.

When pre-cancerous modifications are found in the cervical tissue, prematurely identified and treated, the cervix cancer will not develop².

These lesions are called "cervical intraepithelial neoplasias (CIN)", and divided in CIN 1, CIN 2 and CIN 3. CIN 2 and 3 are considered the real pre-cancerous modifications and are called High-grade squamous intra-epithelial lesion (HGSIL)^{2,3}.

The inappropriate handling of the HSIL can increase the risk of cervical invasive carcinoma and, at the same time, there are complications related to its over-treatment. The main standard surgical management from HSIL in adults women is surgical conization procedure and usually is done trough Loop Electrical Excision Procedure (LEEP)⁴.

Factors related to residual neoplasia and recurrence after conization are the CIN grade, margins and glandular involvement in the conization product, age, race, number of pregnancies and childbirths, socio-

economic level, smoking habits, marital status and association with the human papillomavirus^{5,6,7}. However, not all of these factors are mentioned in all articles and its exact clinical meaning still needs to be established^{5,6,7}.

The persistence of the cervical intraepithelial neoplasia occurs between 5 and 35% after conservative treatment by conization or ablation, probably because of the failure of the primary treatment or new development of the disease. In other words, most of the recurrences occur possibly by residual disease or sub-clinical HPV infection which is not completely eradicated^{8,9,10}.

This study evaluate the epidemiological data of clinical relevance and the histopathological data of the surgical specimen, correlating them to HPV type status and HIV status with the evolution of the patients. These results can reach clinical applicability to early detection of recurrence of the cervical intraepithelial neoplasia treated by conization to establish their real prognostics and to combining more effective strategies of prevention.

METHODOLOGY

The population involved in the study includes patients with a histological diagnosis of HGSIL (CIN 2 and 3) after conical resection performed at the Erasto Gaertner Cancer Center Hospital (EGCCH/HEG) in Curitiba, southern Brazil, from January 2009 to August 2011, using LEEP technique and correlating the epidemiological and the histopathological data of the surgical specimen, correlating them to the evolution of the patients, which were assessed for their ability to predict disease recurrence. The inclusion criteria to time follow up analyzing was minimum of 18 months

The patient sample was divided into two groups:

- The STUDY group- considering patients with recurrence of HGSIL, after treatment by LEEP conization;
- The CONTROL group -considering patients with no recurrence of the disease, after treatment by LEEP conization.

Sample selection

Inclusion Criteria: women accompanied at the EGCCH Low Genital Tract Disease Service, between 19 and 48 years old, who had undergone cervical cytology, colposcopy and biopsy proving HGSIL (CIN 2-3), and treated by conization surgery, identifying any degree of CIN in the histological product of the conization, and with post-treatment clinical follow-up. The follow-up was considered adequate when it was performed via cytology, colposcopy (and biopsy if necessary) at six-month intervals, for at least 18 months. These women were previously submitted to HPV genotyping, using a HPV Genotyping test to HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 73, 82, 26, 59, 53, 66 e 68.

Insufficient clinical data on the medical records, post-conization follow-up time less than 18 months, patients who underwent hysterectomy, presence of invasive carcinoma in a biopsy or in the conization product, no evidence of cervical intraepithelial neoplasia after microscopic evaluation of the histological product of conization was Exclusion Criteria.

Among the patients analyzed, all of them resulted in CIN 2 or 3 in a cervical biopsy before the conization and the histological product of the conization showed results CIN 2 and 3.

This was taken to be recurrence of the disease in the presence of CIN 1, 2 or 3 in cervical cytology, colposcopy and/or biopsy during the follow-up.

This study was properly approved by the Ethics Committee in Research of the EGCCH, under the protocol number 2147.

After applied the exclusion criteria, the study was organized in the following way: among 262 patients, the Study group was formed with 25 patients and the Control group with 237 patients. To avoid a contamination of bias, another arm of study was de 231 patients analyzed with no compromised margins on the conization histologic product (that is excluding compromised margins cases), and so subdivided in Study group with 15 women and Control group with 216 women (Figure 1- Consort Flow diagram).

The conization technique

The conization surgery was performed using LEEP technique, under local anesthesia, with the removal of two pieces, ectocervical and endocervical margins, marked in their real margins with nanquim ink for pathologist to identify where the lesion is located (late studies).

The histopathological analysis for the conization pieces

The evaluation of the histological sections of the conization product of each patient was concentrated on the following queries: diagnosis and the presence or absence of residual disease on margins of the product of conization. The evaluated material was the slides prepared and studied at the time of conization, following the standard criteria of the pathological anatomy service of the referred hospital and revised at the moment of this study. These histological sections were prepared by the conventional technique of haematoxylin eosin.

At the specimen of conization, it was confirmed again the diagnosis of high grade cervical intraepithelial neoplasia, and the divergent cases were excluded.

HPV genotyping

All women are previously submitted to HPV Genotyping Test through real-time PCR technique, including 18 types of HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 73, 82, 26, 59, 53, 66 e 68), at the Laboratory of Molecular Biology at Genetics Department of UFPR/ Brazil.

Risk Factor evaluated

From the 262 patients included in this study, the following data were extracted: age, smoking habits, level of CIN, HIV seropositivity, HPV genotype, number of DNA-HPV *per person* and data about compromised margins.

Statistics analysis

It was made statistics analysis of the data, using the SPSS 19.0 IBM program, searching for a Confidence Interval superior to 95% and the significance level of 5%. An univariate and multivariate analysis were made. The relative risk (RR) was calculated among each variable and the risk to recurrence.

RESULTS

Among the 262 women analyzed, we identified 146 CIN 2 and 116 CIN 3.

In this global group, the median age was 35 years, with minimum of 19 years old and maximum 48 years old, and 78% of them were older than 30 years; 95 (38%) women were smoking; 11 (5%) were HIV positive and 95% of them are DNA-HPV positive (250/262). Among women with DNA-HPV positive, 66% (165/250) were carriers of only 1 type of DNA-virus and 34% (85/250) were carriers of more than 1 DNA-virus type in the same sample.

HPV 16 was founded in 63% of the sample. It was followed by HPV 31 (20%), HPV 33 (12%), HPV 35 (11%), HPV 52 (9%) and HPV 18 (8%). The other subtypes represented less than 5% of samples.

It was identified 12% (31/262) of compromised margins on histological conization product and 88% (231/262) was margins free. Among the 31 women with compromised margins, 15 were compromised in the ectocervical margin, 15 in the endocervical and 1 were in both.

The global recurrence rate was 9.5% (25/262).

The data about HPV infection can be seeing in tables 1 and 2, and shows the rates of incidence and the correlation to recurrence of the disease. In 84% (21/25) of the cases that the recurrence was confirmed, the DNA-HPV 16 was identified, while only 61% in those without recurrence ($p=0.02$).

There wasn't any recurrence in women less than 25 years old and 84% (21/25) of the recurrence were in women older than 30 years old. The RR to recurrence in younger than 30 years old was 1 and those older than 30 years old was 1.14.

The compromised margins of the conization product were the only relative data to the surgical treatment performed that correlated in a significant way with the CIN recurrence ($p= 0.00$) and can be seeing in table 3. The recurrence rate increased as compromised margin progress (external to internal and to both), with percentages of 27%, 33% and 100%, easily observed in table 3.

From women with margins free on the histological conization, the median age was 34 years old, with minimum of 19 years old and maximum of 48 years old; there were 132 (58%) CIN 2 and 98 (42%) CIN 3; 86 (39%) women were smoking; 8 (4%) were HIV positive and 95% of them are DNA-HPV positive (219/231). Among women with DNA-HPV positive, 64% (140/219) were carriers of only 1 type of DNA-virus and 36% (79/219) were carriers of more than 1 DNA-virus type in the same sample.

HPV 16 was founded in 62% (143/231) samples and the recurrence rate was 6.5% (15/231).

The same data were analyzed and compared with de global group and can be seen in table 4, confirming that besides margins, HIV seropositivity and presence of DNA-HPV 16 were statically related with recurrence rates.

The data showed that when the 3 factors are positive in the same time (HIV positive, DNA-HPV16 positive and compromised margin) the RR to recurrence was 25 and when the 3 factors are negative in the same time, the RR decreases to 0.6.

Based on these data, we created a risk score that can be seen in table 5. The data about simultaneous compromised margin (ectocervical and endocervical in the same time) was not included in this table because this data matches only one case.

The univariate and multivariate analysis of the epidemiological data demonstrated that the predictor factors of the unfavorable evolution of the treated CIN are the compromised margins of the conization product, HIV seropositivity and presence of DNA-HPV 16 in the sample.

DISCUSSION

Over the last decades, many epidemiological and laboratorial studies have demonstrated that the cervix invasive carcinoma is a complex disease, with many environmental and genetic determinants^{2,3}. Despite the adequate treatment of the precursor lesion, the CIN recurrence will happen, on average, between 5 and 35% of the cases, what increases the risk for the invasive cancer^{4,5,7}.

The epidemiological data related to recurrence or persistence of a precancerous disease presented in a fairly varied way in literature, once most of the studies are retrospective, limiting the interfering data collection in the success and/or the treatment failure. However, the studies that relate recurrence of the cervical disease with persistence of the infection by the HPV virus in high rates, after the conization surgery, are practically unanimous to affirm that the persistent viral infection is an independent risk factor^{8,11,12}.

The most authors can correlate the recurrence rates of HGSIL with a large numbers of clinical factors, however most of them identified the compromised margins on histological conization product and HIV-infected women with this result^{7,10,13-19}.

As well as in this study, in the others revised, age did not influence considerably the definitive therapeutic result, and a good part of them are very similar in relation to the average age of the patients studied^{6,7,17}. However, in agreeing to these results, some authors identified that young women must have a different natural history of HPV infection and the risk to recurrence is less than in others age. The most of protocols of treatment and follow up about CIN in women less than 25 years old contemplates less aggressive protocols^{4,20}.

The infection by the human immunodeficiency virus also represents an important problem of public health worldwide. Nowadays, the presence of cervix cancer defines the diagnosis of the human immunodeficiency syndrome in an HIV-infected patient, due to high prevalence and incidence of HPV infection and the cervical intraepithelial neoplasia in HIV seropositive patients²¹ and high rate of persistence of HPV associated with HIV.

A HIV positive woman has from two to four times more chance of HPV infection than a seronegative woman and the CD4 rates less than 200 and a high viral load also increase in three times the risk of HPV co-infection, when it is compared to a HIV negative woman^{21,22}.

We corroborate with the authors^{15,21-24} who associated the recurrence and/or progression of the cervical disease with the HIV seropositivity, but some only evidenced this association according to the immune *status* of the patient, in other words, when the CD4 is smaller than 200 or presents a high viral load. However this immune status was a limitation of this study, because it has not details about the immune-suppressive rate of each patient studied and considering the variation from the immune status.

Concerning the performed CIN treatment and the risk of residual disease, it is almost unanimity that the compromised cone margins are a main predictor factor of therapeutic failure. Some of them attribute to the ectocervical margin as well as the endocervical margin the association with the persistence of the disease^{7,10,12-17,24} and others attribute only to the endocervical margin^{14,16,17,24}.

In Thailand, another similar study²⁵ concluded that the presence of the extensive compromised endocervical cone margin is a strong predictor of residual disease, but this study only evaluated patients with an average age of 48.6 years old, what explains such finding, once the menopausal patients are going to present the squamocolumnar junction entering or totally internal to the endocervical canal, and that increases the risk of residual disease presented in the endocervical margin. However, this study identified the more higher recurrence rate in women with endocervical compromised margin than an ectocervical.

In another retrospective study of the analysis of the persistence or recurrence of the cervical intraepithelial neoplasia in patients submitted to conization, in a similar way, Park *et al* observed a recurrence rate of 4.2%. They concluded that the detection of high levels of High-risk human papilloma virus before

conization is the only risk to higher rate of persistent/recurrent histological abnormalities after conization for CIN¹¹.

In a similar way, Ovestad *et al*²⁶ concluded that cases negatives for DNA-HPV 16 infection have more chance of spontaneous regression of HGSIL. Either, Loffredo D'Ottaviano *et al*²⁷ detected HPV 16 at admission in 58% of the cases that persisted/ progressed and concluded that CIN 2 associated to HPV 16 was more likely to persist or progress to CIN 3.

Similar to these study, Lima *et al* concluded that the risk factors associated to the recurrence of the cervical intraepithelial lesions were: HIV seropositivity, glandular occupation and compromised conization margins⁶.

In our study, when we analysed all the group, we identified the compromised margin, HIV positive and the presence of DNA-HPV 16 as prognostic factors of recurrence. So, like compromised margin was a very important factor statistically related to recurrence, the compromised margin was excluded and, in margins free women, the prognostic factors (HIV positive and DNA-HPV 16) were confirmed.

Comparing all the studies revised we can see these results been repeted so many times (table 6), however, in none of them we identified all the 3 factors been recognized simultaneously like a prognostic fator of recurrence to HGSIL treated.

It seems that, considering our own results that compromised margins are very important in the recurrence risk, and associated to the presence of DNA-HPV 16, age more than 25years and HIV positive, the risk of recurrence is much higher (RR 25).

Taking in consideration all of these data, the authors conclude that compromised margins on histological product of conization, HIV positive status and detection of DNA-HPV 16 are the factors related to recurrence after conization on HGSIL, and, in these cases, rigorous follow up is necessary or maybe a new intervention must be done to reduce de risk to recurrence or progression to cancer.

REFERENCES

1. WHO. Cervical Cancer. Internet. Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en>. Acesso em 14.mar.2016.
2. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. Int J Gynecol Pathol. 1993; 12(2):186-92.
3. IARC. International Agency for research on Cancer Monographs of evaluation of carcinogenetic risks to humans. Lyon, France. 1995; 49:1409-1995. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 02.Jul.2009.
4. Wright Jr TC, Massad S, Dunton JC, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon DD .2006 Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. AJOG, 2007, October:340-345, Avaliable from: www.AJOG.org. Acesso em 08.set.2009.
5. Ramos MC, Pizarro de Lorenzo BH, Michelin MA, Murta EF. High grade cervical intraepithelial neoplasia, human papillomavirus and factors connected with recurrence following surgical treatment. Clin Exp Obstet Gynecol. 2008; 35(4):24-27.
6. Lima MI, Tafuri A, Araújo AC, Lima LM, Melo VH. Cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization in HIV-positive and HIV-negative women. Inter J Gynaecol Obstet. 2009; 104(2):100-4.

7. Jin J, Li L, Zhang F. Metaanalysis of High Risk factors of residue or relapse of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015 AprJun; 29(2):4518.
8. Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol*. 2000; 79(2):294-9.
9. Baloglu A, Uysal D, Bezircioglu I, Bicer M, Inci A. Residual and recurrent disease rates following LEEP treatment in high-grade Cervical intraepithelial lesions. *Arch Gynecol Obstet*. 2010; 282: 69-73.
10. Lubrano A, Medina N, Benito V, Arencibia O, Falcón JM, Leon L *et al*. Follow-up afeter LLETZ: a study of 682 cases of CIN 2- CIN 3 in a single institution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012; 161:71-4.
11. Park JY, Lee KH, Dong SM, Kang S, Park SY, Seo SS. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/ recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol*. 2008; 108(3):549-54.
12. Prato B, Ghelardi A, Gadducci A, Marchetti I, Di Cristofano C, Di Coscio G *et al*. Correlation of recurrence rates and times with posttreatment human papillomavirus status in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Cancer*. 2008; 18:90-4.
13. Flannelly G, Bolger B, Fawzi H, De Lopes AB, Monaghan LM. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? *BJOG*. 2001; 108(10):1025-1030.
14. Ghaem-Maghani S, De-Silva D, Tipples M, Lam S, Perryman K, Soutter W. Determinants of success in treating cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG*. 2011May; 118(6):679-84.
15. Lodi CT, Michelin MA, Lima MI, Teixeira NC, Adad SJ, Murta EF *et al*. Factors associated with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization in HIV-infected and noninfected women. *Arch Gynecol Obstet*. 2011 Jul; 284(10):191-7.
16. Malapati R, Chaparala S, Cejtin HE. Factors influencing persistence or recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure. *J Low Genit Tract Dis*. 2011 Jul; 15(3):177-9.
17. Serati M, Siesto G, Carollo S, Formenti G, Riva C, Cromi A, Ghezzi F. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization: a 10-year study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012Nov; 165(1):86-90.
18. De Mello Silva MV, Coutinho IC, De Andrade Heráclio S, Fittipaldi HM, Katz L. Factors associated with the persistence/ recurrence of CIN 2/3 in women submitted to loop electrosurgical excision procedure in a teaching hospital in northeastern Brazil: a case-control study. *J Low genit Tract Dis*. 2014Oct; 18(4):286-90.
19. Van Bogaert U. Involved LEEP excision margin as predictor of residual/ recurrence disease in HIVpositive and HIVnegative women in a low-resource setting. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. 2015 Apr; 37(2):105-8.
20. Frega A, Stentella P, De Ioris A, Piazze JJ, Fambrini M, Marchionni M *et al*. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. *Cancer Letters*. 2003; 196(2):127-34.
21. Pantanowitz L. Treatment failure and recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. *Women's Health*. 2010; 6(6): 781-3.

22. Nappi L, Carriero C, Bettocchi S, Herrero J, Vimercati A, Putignano G. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Aug1; 121(2):226-32.
23. Bambury I, Mullings A, Fletcher H, Johnson N, Tolluch Reid M. Cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of HIV positive women at the University of the West Indies: management and outcome. *West Indian Med J.* 2013; 62(4):31-37.
24. Huchko MJ, Leslie H, Maloba M, Zakaras J, Bukusi E, Cohen CR. Outcomes Up to 12 months after treatment with Loop Electrosurgical Excision procedure for cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2015 Jun1; 69(2):200-5.
25. Kietpeerakool C, Khunamornpong S, Srisomboon J, Siriaunkgul S, Suprasert J. Cervical intraepithelial neoplasia II-III with endocervical cone margin involvement after cervical loop conization: is there any predictor for residual disease? *J. Obstet Gynaecol Res.* 2007; 33(5):660-4.
26. Ovestad I, Gudlaugsson E, Skaland I, Malpica A, Munk AC, Janssen EA, Baak JP. The impact of epithelial biomarkers, local immune responses and human papillomavirus genotype in the regression of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. *J Clin Pathol.* 2011 Apr; 64(4):303-7.
27. Lofreddo DÓtaviano MG, Discacciati MG, Andreoli MA, Costa MC, Termini L, Rabelo-Santos SH et al. HPV 16 is related to the progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2: a case series. *Obstet Gynecol Int.* 2013; 32:89-09.

Figures

Figure 1- Diagram Consort Flow (ANEXXES)

Tables

HPV SEROTYPE	CIN2 (n=146)	% CIN2	CIN3 (n=116)	% CIN3
16	83/146	57%	81/116	70%
31	32/146	22%	17/116	15%
33	18/146	12%	12/116	10%
35	16/146	11%	11/116	9%
52	09/146	6%	14/116	12%
18	9/146	6%	10/116	9%

SEROTYPES MORE PREVALENTS IN GROUPS/ n = 262/250 WOMEN DNA-HPV POSITIVE

Table 1 –Percentage diagnosis of DNA-HPV serotype in cases of CIN 2 and 3.

SEROTYPE HPV	CIN 2 (n=146)	PERCENTAGE+ IN RECURRENCE	CIN 3 (n=116)	PERCENTAGE+ IN RECURRENCE
16	9/10	90%	12/15	80%
35	2/10	20%	1/15	7%
33	3/10	30%	0/15	0%
31	0/10	0%	0/15	0%
52	1/10	10%	2/15	13%
More than 1 serotype per person	6/10 *	60%	4/15	27% *

n= 262 women/ 25 cases of recurrence

Note: Between the 12 cases of DNA-HPV negative, 100% were margins free and only 1 case of recurrence of CIN 3.

Note: * Having more than 1 type of HPV represents a RR of 3.6

Table 2- Correlation between prevalence of serotype of DNA-HPV and percentage of its diagnosis on cases with recurrence.

Compromised Margins	Control group (n=237)	Case group (n =25)	Recurrence rate	Relative Risk (RR)	p value
Both free	216	15	6.5% (15/237)	0.9	0.00
Ectocervical	11	4	27% (4/15)	4.3	0.00
Endocervical	10	5	33% (5/15)	5.5	0.00
Both compromised	0	1	100% (1/1)	16	0.00
	237	25			

262 women / 12% compromised margin / 9.5% global recurrence rate

Table 3- Correlation between compromising margins, recurrence rates, Relative risk to recurrence and p value.

	Global Data (n=262)	Recurrence Rate	p value	Margins free Data	Recurrence Rate	p value/ RR
Age	<u>case group</u> 36±7 (IC33-39) min 26 max 48			<u>case group</u> 35±7 (IC30-38) min 26 max 48		
	<u>control group</u> 35±7 (IC34-36) min 19 max 48			<u>control group</u> 35±7 (IC34-36) min 19 max 48		
CIN grade	CIN 2-56% (n=146)	6.8% 10/146	p=0.13	CIN 2- 58% (n=133)	5% (7/133)	p=0.42
	CIN 3- 44% (n=116)	13% (15/116)		CIN 3- 42% (n=98)	8% (8/98)	
HIV seropositivity	positive - 11/242	50% (5/11)	p=0.00	positive - 8/212	50% (4/8)	p=0.00 RR=12
	negative - 231/242	8%(8/231)		negative - 204/212	5% (10/204)	
Types DNA- HPV	one: 66% (165/250)	9% (14/165)	p= 0.64	one: 64% (140/219)	4% (5/140)	p=0.07 RR=3.6
	multiple: 34% (85/250)	12% (10/85)		multiple: 36% (79/219)	11% (9/79)	
Presence DNA-HPV 16	positive 63% (164/262)	13% (21/164)	p=0.02	positive 62% (143/231)	9% (13/143)	p=0.05 RR=4.5
	negative 37% (98/262)	4% (4/98)		negative 38% (88/231)	2% (2/88)	

Note: 262 Eligible women/ 231 Margin free conization/ 242 HIV tests/ 250 women DNA-HPV positive.

Table 4- Epidemiological profile of data correlated to recurrence rate of HGSIL and the Relative Risk (RR) related to recurrence.

Prognostic factor	Recurrence rate	Relative risk
ALL FACTORS NEGATIVE	2.6%	0.67
Margin free	6.5%	0.9
Ectocervical compromised margin	27%	4.3
DNA-HPV 16 positive	9%	4.5
Endocervical compromised margin	33%	5.5
HIV positive	50%	12
ALL FACTORS POSITIVE	50%	25

Table 5 – Risk score to evaluate the probability of recurrence on HGSIL treated by conization.

Author/ year	HIV positive	DNA-HPV 16 (or HR-HPV) positive	Compromised margin on conization product
Flannelly et al, 2001	No tested	No tested	Positive
Maluf et al, 2004	No tested	No tested	Positive
Prato et al, 2008	No tested	Positive	Positive
Lima et al, 2009	Positive	No tested	Positive
Baloglu et al, 2010	No tested	Positive	Positive
Ghaem-maghami et al, 2011	No tested	No tested	Positive
Lodi et al, 2011	No tested	Negative	Positive
Malapati et al, 2011	Positive	No tested	Positive
Lubrano et al, 2012	No tested	Positive	Positive
Russomano et al, 2013	Positive	No tested	Positive
De Mello Silva et al, 2014	No tested	No tested	Positive
Jin et al, 2015	Negative	Positive	Positive
van Bogaert et al, 2015	Positive	No tested	Positive

Table 6 – Correlation among authors to positive factors related to recurrence of HGSIL treated by conization.

The role of p16 and risk factors in the management of High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (HSIL) to improve the diagnosis and predict the differences in biological evolution.

Institutions: Universidade Federal do Paraná – Curitiba (PR)/ Brazil and Hospital Erasto Gaertner, Curitiba (PR)/ Brazil

Authors:

Fernanda Villar Fonseca¹

Newton Sérgio de Carvalho².

Maria da Graça Bicalho³.

Teresa Cristina Cavalcante⁴.

1. M.D, Gynecologist-Obstetrician and Colposcopy experience/ Gynecologic Oncology Department/ Erasto Gaertner Cancer Center Hospital/ Brazil;

2. M.D. Ph.D, Gynecologist-Obstetrician and Colposcopy experience/ Full professor of Gynecology / Gynecology and Obstetrics Department/ Federal University of Parana/ Brazil;

3. M.D.PhD, Full professor of Genetics; Laboratory of Molecular Biology and Immunogenetic and Histocompatibility from Genetics Department/ Federal University of Parana/ Brazil;

4. M.D. Ph.D, Pathologist/ Pathology Department/ Associate Professor / Federal University of Parana/ Brazil.

Short Summary

A study on cervical HSIL, managed by conization, and submitted to immunostaining by p16^{INK4a} and DNA HPV detected, in an attempt to correlate overexpression with degree of severity of lesion, risk of recurrence and biological differences among CIN 2 and 3.

Address:

Fernanda Villar Fonseca- Hospital Erasto Gaertner, rua Doutor Ovande do Amaral, 201, Jardim América, Curitiba, Paraná – Brasil. CEP 81520-060.

e-mail: luifernascimento@terra.com.br

Contact: luifernascimento@terra.com.br or fone number: 55-41-91984902 or fax number: 55-41-30898888

Abstract: 250 words/ Text: 3201 words/ Figures: 2 / Tables: 5

Conflict of interest: the authors there are no conflict of interest and the research was totally paid by the authors and their institutions.

Abstract

To evaluate the expression of biomarker p16^{INK4a} on the product of conization in women diagnosed with HSIL and correlate the immunostaining with severity of lesion, the ability to predict recurrence and the biological differences among CIN 2 and 3. **Methods:** A retrospective review was conducted in patients who had undergone conization due to HSIL, DNA-HPV previously detected, from January 2009 to August 2011, at Erasto Gaertner Cancer Center (EGCC) Hospital, in Brazil. The expression of p16^{INK4a} was evaluated using the tissue microarray technique and the overexpression was correlated to clinical diagnosis and the prognosis of CIN2 and 3 treated. Chi-square test was used for statistical analysis with p-value less than or equal to 0.05 and the sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy of the tests calculated. **Results:** were included 192 women, between 22 to 48 years old (35±6), divided in two groups: 102 CIN2 and 90 CIN 3. The median age, parity, smoking habits and conization technique were similar in the two groups. p16 was positive in 86% of the CIN 2 and 92% of CIN 3. To predict recurrence: PPV 11%, NPV 95%, Sensitivity 95%, Specificity 11% and Accuracy 93%. The ability of p16 to distinguish among CIN 2 and 3: VPP 48%, VPN 66%, Sensitivity 92%, Specificity 13% and Accuracy 89%. **Conclusion:** The immunostaging of biomarker p16 alone are not able to predict the rate of recurrence of HSIL and to demonstrate the biological differences among CIN 2 and 3, however the overexpression increases with degree of severity of lesion.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia, recurrence, biological biomarkers, HSIL.

INTRODUCTION

P16 is a cyclin-dependent kinase-4 inhibitor that is expressed in a limited range of normal tissues and tumors. In recent years, immunohistochemistry with p16 antibodies has been used as a diagnostic aid in various scenarios in gynecologic pathology. Like with all markers, in each of these scenarios, p16 is neither 100% specific nor sensitive for a given lesion. However, there are several areas where p16 is of undoubted value¹.

Diffuse (as opposed to focal) positivity with p16 in the cervix can be regarded as a surrogate marker of the presence of high-risk human papillomavirus (HPV). In cervical squamous lesions, p16 is positive in most high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and in some cases of low-grade CIN, usually those associated with high-risk HPV¹.

There is no doubt that since the Papanicolaou (Pap test) cytological screening for cervical precancerous lesions was introduced in the 1940s, there has been a significant reduction in the incidence and mortality from cervical cancer^{2,3}.

Because of the significant inter and intra-observer variability in interpreting both Pap smears and cervical biopsy specimens, and the relatively low sensitivity of Pap smears, the search is on for better biomarkers to assist the screening for diagnosis on cervical neoplasia^{2,3}.

Research nowadays is focused on the development of objective biomarkers that can distinguish transforming from productive HPV infections and predict disease severity. The cellular tumor suppressor protein p16^{INK4a} (p16) has been identified as a biomarker for transforming HPV infections^{2,3}.

Even with appropriate treatment of the precursor lesion of cervical cancer, there is still the risk of recurrence of HSIL during the life. And, at the same time, there remains the risk of developing an invasive carcinoma over time⁴. But it's still not possible to predict which cases of CIN will progress or regress⁴.

The present study aims at assessing the expression of biomarkers p16^{INK4a}, in samples of conization of patients diagnosed with high-grade cervical intraepithelial neoplasia, using immunohistochemistry in tissue microarrays (TMA), and correlating this expression with the ability to predict the severity of the disease, recurrence rate of HSIL treated and biological differences among CIN 2 and 3, correlating all these data to high-risk HPV.

MATERIAL AND METHOD

A Cross- sectional study was conducted.

The population involved in the study includes patients with a histological diagnosis of High-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/ 3) after conical resection, performed at the Erasto Gaertner Cancer Center Hospital (EGCCH), in Curitiba, southern Brazil, from January 2009 to August 2011, using LEEP technique. The HPV serotypes, previously known, were correlated with the immunohistochemical expression of p16^{INK4a}, with the epidemiological and histopathological data of the surgical specimen, with the evolution of the patients and also with the severity of the disease.

The patient sample was divided into two groups:

- CIN 2 group: diagnosis of CIN 2, after treatment by LEEP conization, with suitable follow up;
- CIN 3 group: diagnosis of CIN 3, after treatment by LEEP conization, with suitable follow up.

Sample selection:

Inclusion criteria: women accompanied at the EGCCH at Lower Genital Tract Disease Sector, between 19 and 48 years old, who had undergone cervical cytology, colposcopy and biopsy proving HSIL (CIN 2/3), who accepted to perform HPV Genotyping Test and treated by conization surgery, identifying CIN 2-3 in the histological product of the conization, and with post-treatment clinical follow-up for at least 18months, that including cytology, colposcopy (and biopsy if necessary) each six-month intervals.

Exclusion criteria: patients who underwent hysterectomy, presence of invasive carcinoma in a biopsy or in the conization product, no histological evidence of cervical intraepithelial neoplasia after evaluation of the product of conization.

Among the patients analyzed, all of them resulted in CIN 2 or 3 in a cervical biopsy before the conization and the histological product of the conization showed results between CIN 2 and 3.

This was taken to be recurrence of the disease in the presence of any degree of CIN (1, 2 or 3) in cervical cytology, colposcopy and/or biopsy during the follow-up.

This study was approved by the Ethics Committee in Research of the EGCCH, under the protocol number 2147.

Among the 500 patients treated by conization in the above - mentioned period, applying the exclusion criteria resulted in 262 eligible patients, 146 women diagnosed with CIN 2 and 116 diagnosed with CIN3 and of this total, 250 were positive for DNA -HPV and 12 negative HPV DNA, and 242 were carriers of result for the enzyme immunoassay Elisa (testing for HIV 1 and 2), and the positive cases were confirmed by Western blot.

In this global group it was identified the prognostic factors related to recurrence.

Another arm of study was de 231 patients analyzed with no compromised margins on the conization histologic product (that is excluding compromised margins cases), to avoid a contamination of bias, and to them the prognostic factors were identified again.

After preparing the slides by Tissue microarrays technique (TMA), the number of patients, excluding technique troubles, results in 192 cases, divided in 102 CIN 2 and 90 CIN3 and prognostic factors identified one more time.

These 3 groups were compared to identify the real prognostic factors related to recurrence and these data correlated to p16 immunostaging.

The study design is established in Figure 1 in accordance with Consort statement.

The Conization technique:

The conization surgery was performed using LEEP technique: the loop electrosurgical excision procedure (LEEP), under local anesthesia, with the removal of two pieces. The ectocervical and endocervical margins were marked in their real margins with Nanquin ink for late studies.

The histopathological analysis for the conization pieces:

The evaluation of the histological sections of the conization product of each patient was concentrated on the following criteria: diagnosis and the presence or absence of residual disease on margins of the product of conization. The evaluated material was the slides prepared and studied at the time of conization, following the standard criteria of the pathological anatomy service of the referred hospital and at the moment of this study, revised. These histological sections were prepared by the conventional technique of haematoxylin eosin.

HPV genotyping results:

All women were previously submitted to HPV Genotyping Test (Polimerase Chain Reaction, conventional technique), including 18 types of HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 73, 82, 26, 59, 53, 66 e 68) and they were from Laboratory of Molecular Biology from Genetics Department of UFPR/ Brazil.

Technique for the preparation of slides to carry out the immunohistochemistry:

The expression of proteins p16^{INK4a} was observed on slides prepared by the tissue microarray technique (TMA), using the original paraffin blocks of the conization product of each patient, in cuts of 5µm. The slides were prepared separately for slides of haematoxylin eosin.

The immunohistochemistry kits used were:

- Prediluted antibody p16 (monoclonal mouse, clone 6H12, diluted 1:100, Novocastra®).

After preparing the slides, they were submitted to the following processes: deparaffinization; antigen retrieval with citrate pH 6.0; endogenous peroxidase block; dilution of each antibody 1:100 and

application of the primary antibody on each slide after washing with PBS specific to each immunomarker; application of secondary antibody and, lastly, application of the specific DAB and counterstaining.

The immunohistochemical elements were defined in the Klaes *et al*⁵ and Fonseca *et al*⁶ similarity search and were subdivided in qualitative and quantitative analysis.

In the qualitative analysis the reaction was considered positive when impregnated with brownish staining of the nuclei and/or cytoplasm of at least 25% of viable assessable sample of the lesion. The reaction was considered negative when there was no staining characteristic of an immunohistochemical reaction.

The positive reaction was divided into two groups: strong positive (when the intensity was similar to the control) and weak positive (when the intensity of staining was substantially less than that of the positive control used, only clearly observable with a 100-fold increase).

The quantitative analysis was classified as: diffuse positivity (the reaction was positive in an extension which included over 50% of the viable assessable sample), multifocal intense positivity (the reaction was positive in an extension which comprised between 25 and 50% of the viable assessable tumor sample) and mild multifocal positivity (the reaction was positive in an extension which included less than 25% of the viable assessable sample).

For p16 immunolocalization was still determined: nuclear pattern of positivity, cytoplasmic pattern of positivity, simultaneous nuclear and cytoplasmic pattern.

The overexpression of P16 can be seen in figure 2.

Blinding of the study:

Each tissue slide was prepared with ten samples, with no identification of the group they belong to, to the immunohistochemical reading be “blind” for the observer.

Risk Factor evaluated

From the patients included in this study, the following data were extracted: age, smoking habits, level of CIN, HIV seropositivity, HPV genotype, number of DNA-HPV *per person* and data about compromised margins.

Statistics analysis:

The analysis of the data was made using the SPSS 19.0 program, searching for a Confidence Interval superior to 95% and the significance level of 5%. In the analysis of the immunomarkers, the comparison of the positivity of the immunoreaction between the groups was carried out using the chi-square test and/or the exact Fischer test and the p-value was identified. The positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), sensitivity, specificity and accuracy of p16 were calculated to predict recurrence and the biological difference among CIN 2 and 3.

RESULTS

Among the 262 women analyzed, we identified 146 CIN 2 and 116 CIN 3.

In this global group, the median age was 35 years, with minimum of 19 years old e maximum 48 years old, and 78% of them were older than 30 years; 95 (38%) women were smokers; 11 (5%) were HIV positive and 95% of them were DNA-HPV positive (250/262). Among women with DNA-HPV positive,

66% (165/250) were carriers of only 1 type of DNA-virus and 34% (85/250) were carriers of more than 1 DNA-virus type in the same sample.

HPV 16 was founded in 63% of the total sample. It was followed by HPV 31 (20%), HPV 33 (12%), HPV 35 (11%), HPV 52 (9%) and HPV 18 (8%). The other types represented less than 5% of sample.

It was identified 12% (31/262) of compromised margins on histological conization product and 88% (231/262) was margins free. Among the 31 women with compromised margins, 15 were compromised in the ectocervical margin, 15 in the endocervical margin and 1 were in both.

The global recurrence rate was 9.5% (25/262).

In 84% (21/25) of the cases on that recurrence was confirmed, the DNA-HPV 16 was identified.

There wasn't any recurrence in women less than 25 years old and 84% (21/25) of the recurrence were in women older than 30 years.

The compromised margins of the conization product were the only relative data to the surgical treatment performed that correlated in a significant way with the CIN recurrence ($p=0.00$) and can be seen in table 1.

From women with margins free on the histological conization product, the median age was 34 years old, with minimum of 19 years old and maximum of 48 years old; there were 133 (58%) CIN 2 and 98 (42%) CIN 3; 86 (41%) women were smokers; 8 (4%) were HIV positive and 95% of them were DNA-HPV positive (219/231). Among women with DNA-HPV positive, 64% (140/219) were carriers of only 1 type of DNA-virus and 36% (79/219) were carriers of more than 1 DNA-virus type in the same sample.

HPV 16 was founded in 62% (143/231) samples. And the recurrence rate was 6.5% (15/231).

Among the 192 cases tested to p16 (TMA data), there were 102 CIN 2 and 90 CIN 3.

In this TMA group, the median age was 35 years, with minimum of 22 years old e maximum 48 years old; 76 (41%) women were smokers; 9 (5%) were HIV positive and 96% of them are DNA-HPV positive (185/192). Among women with DNA-HPV positive, 65% (121/185) were carriers of only 1 type of DNA-virus and 35% (64/185) were carriers of more than 1 DNA-virus type in the same sample.

HPV 16 was founded in 63% of the sample. It was followed by HPV 31,33,35,52 and 18. The other types represented less than 5% of samples.

It was identified 14% (27/192) of compromised margins on histological conization product and 86% (165/192) was margins free.

The global recurrence rate was 10% (20/192).

The compromised margins of the conization product result in a recurrence rate of 37% while free margins in 6% ($p=0.00$).

The same data were analyzed and compared with de global group, margins free group and TMA group and can be seen in table 2, confirming that besides margins, HIV seropositivity and presence of DNA-HPV 16 were statically related with recurrence rates of HSIL.

The overexpression of immunomarker p16 demonstrated gradual increase in the positive reaction related directly with the degree of neoplasia. Nevertheless no statistical difference was shown regarding the degree of severity in the histological product of the conization, between the groups (CIN 2 and 3), in terms of the risk of recurrence and biological differences among CIN 2 and 3, according to the evidence in table 3.

p16 was expressed in 86% of the CIN 2 group patients and in 92% of the control group. In the quantitative analysis of p16, we can see that negative or mild reaction are expressed in 29% of CIN 2 and in only 13% of CIN 3, and this result was really significant, showing the high VPN of p16 (table 3).

In the analysis of the immunomarker, p16 was assessed for recurrence and/or biological differences among CIN 2 and 3 and the positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the test, the sensitivity, specificity and accuracy of it can be seen in table 3.

In the quantitative analysis, sharing the p16 expression in 2 categories: negative or mild positivity and diffuse positivity or multifocal intense positivity and correlating to recurrence, we identified PPV of 11%, NPV of 95%, Accuracy of 78% and a Relative Risk (RR) of 2,29 to predict the recurrence.

The data didn't demonstrate any difference among the overexpression of p16 when correlating to HIV seropositivity, margins on conization product, DNA-HPV quantity by specimen and the presence of DNA-HPV 16, as can be seen in table 4.

Based on these data we created a score risk to recurrence of HSIL treated by LEEP, as can be seen in table 5. The compromised margin was the most important prognostic factor related to the recurrence. When all the prognostic factors are negative at the same time the RR to recurrence is not significant, however, when all of them are positive the RR is much higher.

DISCUSSION

The natural history of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is extremely variable. If left untreated, CIN may regress to normal, persist or progress to invasive cancer. Several studies have shown that approximately one-third to one-half of cases of CIN 1 and CIN 2 spontaneously regress without treatment and CIN 3 more frequently progress⁷⁻¹⁰.

It is not possible at present to predict which cases of CIN will progress and which will persist or regress. The probability of an atypical epithelium becoming invasive cancer increases with the severity of the atypia, but does not occur in even case, reflecting biological diversity of the disease⁷⁻¹⁰.

CIN 2 thus is a borderline lesion, can show clinical behavior similar to CIN 1 or to CIN 3, and occurs often in young women. The pattern of HPV infection and reinfection in women and the outcome of CIN 2 are not well known. A better discrimination of CIN 2 that tend to progression or regression could help in choosing the best clinical management¹⁰.

The progress in the understanding of HPV-related cervical carcinogenesis promoted the evaluation of various biomarkers that could potentially improve the current methods of cervical cancer screening, and p16 is one of the most promising. However, there is no general consensus for establishing threshold values above which a sample become "p16 positive"².

A number of recent studies have demonstrated that p16 may be a useful marker for squamous dysplasia in the uterine cervix diagnosis, because its expression appears to correlate with the degree of cervical neoplasia^{2,11-18}. And some can correlate the overexpression of p16 with High-Risk HPV besides de cervical degree^{2,11,16,18}.

However, few studies related immunoreactivity with recurrence and/or prognosis of the disease^{3,6,9,12,19-25}.

In contrast, there is still a lot of heterogeneity in relation to the results achieved in the expression of p16 to quantify their expression in accordance to the degree of intraepithelial neoplasia and their clinical significance in current literature³⁻²⁵.

Nowadays, it still remains a challenge to predict which group of women represents high risk to develop invasive cancer, mainly among CIN 1 and CIN 2 cases and, consequently, avoiding damages to their reproductive future at the same time that increases life expectancy.

This research was not able to demonstrate an specificity of overexpression of p16 to distinguish biologic differences among CIN 2 and 3 at the same way that some authors related among CIN 1 and CIN 2/3^{9,13,20,23,25}. However, the diffuse positivity to p16 was more frequently in CIN 3 than CIN 2 ($p=0.02$) and was showed a tendency for the same data in recurrence cases comparing with no recurrence ($p=0.62$).

Guerra²² debate that p16 is a cell proliferation marker with low specificity to evaluate the progression of the disease but highly expressed in recurrent lesions and with high negative predictive value (NPV), like the data produced by our research group previously⁶, and in this time.

Tsompou² discuss the role of p16 as a marker of severity of CIN. To them the overexpression of p16 in CIN 2 is around 44-92% and in CIN 3 around 72-92%. Also discuss the diffuse staining like a progression risk in low-grade dysplastic lesion of the cervix uteri. To them, diffusely positive CIN 1 progress more frequently to CIN 2-3 with a PPV of 39% and a NPV around 85 to 96%. In the same way, the progression of CIN 2 to 3 can be correlated with diffuse staining in same cases².

According to those data, Tsompou² concluded that although there is good evidence that p16^{INK4a} immunostaining correlates with the severity of cytological/histological abnormalities, the reproducibility is limited due to insufficiently standardized interpretation of the immunostaining. Therefore, a consensus needs to be reached regarding the evaluation of p16^{INK4a} staining and the biomarker needs to be assessed in various clinical settings addressing specific clinical questions.

It was a limitation of this research the relatively low number of cases, due to the great loss of cases in the TMA preparing, but CIN is a lip-deep lesion and, sometimes, focal lesion, and it limits the possibility to get multiple slides in a great number of biopsies.

Considering all these data, it seems that the expression of p16 in the cervix strongly shows the relationship between the severity of HPV infection and the development of cervical intraepithelial neoplasia and its degree of severity, but alone it still cannot be considered as a marker capable of predicting disease recurrence and biological differences among CIN 2 and 3.

The diffuse positivity in the overexpression of p16 seems to show a certain trend to correlate de biological differences among CIN 2 and 3 and rate recurrence, and maybe a larger study can prove it.

REFERENCES

1. O'Neill CJ, McCluggage WG. P16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol*. 2006; 13(1): 8-15.

2. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB and Koutsky LA. P16^{INK4a} expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol.* 2003; 16(7):665-73.
3. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Malamou-Mitsi V and Paraskevaidis E. p 16 (INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2009; 35(3):210-20.
4. 2006 Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *AJOG.* 2007, October: 340-345.
5. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16INK4A as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.*2001; 92: 276-84.
6. Fonseca FV, Tomasich FDS, Jung JE, Maestri CA, Carvalho NS. The role of p16 (INK4a) and p53 immunostaining in predicting recurrence of HG-CIN after conization treatment. *Rev Col Bras Cir.*2016; 43(1):035-041
7. Syrjanen K, Kataja V, Yliskoski M, Chang F, Syrjanen S, Saarikoski S. Natural history of cervical human papillomavirus lesions does not substantiate the biologic relevance of the Bethesda System. *Obstet Gynecol.*1992May; 79(5(Pt1)):675-82.
8. Ostor AG. Natural history of Cervical Intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.*1993; 12:186-92.
9. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(7):2407-14.
10. Loffredo D'Ottaviano MG, Discacciati MG, Andreoli MA, Costa MC, Termini L, Rabelo-Santos SH et al. HPV16 is related to the progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2: a case series. *Obstet Gynecol Int.*2013; 2013:1-5.
11. Keating JT, Cviko A, Reithdorf S, Reithdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K and Crum CP. Ki-67, cyclin E, and p16^{INK4} are complimentary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(7):884-91.
12. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Conception Bratti M, Wright T, Rodrigues AC, Chen S, Reichert A *et al.* Validation of p16^{INK4a} as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a Population-Based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13(8): 1355-60.
13. Queiroz C, Silva TC, Alves VAF, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, Araújo Filho JB, Studart E, Cheto T and De Freitas LAR. p16^{INK4a} expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006; 202(2):77-83.
14. Bragança JF, Sarian LO, Pitta DR, Maito AB, Vassalo J, Pignataro F, Andrade LA and Derchain S. Expression of p16 INK4a and cervical infection with high-risk human papillomaviruses are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2008; 18(5):1060-4.

15. Demir F, Kimiloglu E, Igdem AA, Ayanoglu YT, Erdogan N. High risk HPV in situ hybridization, p16INK4A, and surviving expressions in cervical carcinomas and intraepithelial neoplasmsÇ evaluation of prognostic factors. *Eur J gynaecol Oncol.* 2014; 35(6):708-17.
16. Krishnappa P, Mohamad IB, Lin YJ, Barua A. Expression of p16 in high-risk human papillomavirus related lesions of the uterine cervix in a government hospital, Malaysia. *Diagn Pathol.* 2014; 9:202.
17. Valasoulis G, Stasinou SM, Nasioutziki M, Athanasiou A, Zografou M, Spathis A *et al.* Expression of HPV-related biomarkers and grade of cervical intraepithelial lesion at treatment. 2014 Feb; 93(2):194-200.
18. Chang MS, Oh S, Jung EJ, Park JH, Jeon HW, Lee TS *et al.* High-risk human papillomavirus load and biomarkers in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. 2014 May; 122(5):427-36.
19. Alshenawy HA. Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesion: potential utility in diagnosis and prognosis. *Pathol Res Pract.* 2014 Dec; 210(12):916-21.
20. Liao GD, Sellors JW, Sun HK, Zhang X, Bao YP, Jeronimo J at al. P16INK4A immunohistochemical staining and predictive value for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1: a prospective study in China. *Int J Cancer.* 2014 Apr 1; 134(7):1715-24.
21. Calil LN, Edelweiss MI, Meurer L, Igansi CN, Bozzetti MC. P16INK4A and Ki67 expression in normal, dysplastic and neoplastic uterine cervical epithelium and human papillomavirus (HPV) infection. *Pathol Res Pract.* 2014 Aug; 210(8):482-7.
22. Guerra F, Rocher AE, Hidalgo JV, Diaz L, Vighi S, Cardinal S, Tatti S, Cúneo N, Gay GP, Camporeale G and Palaoro LA. Argentophilic nucleolus organizer region as a proliferation marker in cervical intraepithelial neoplasia grade 1 of the cervix. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014; Jun 40(6): 1717-1724.
23. Da Costa LB, Triglia R de M, França Junior MC, Andrade LA. P16(INK4A) expression as a potencial marker of low-grade cervical intraepithelial neoplasia progression. *APMIS.* 2015 Mar; 123(3):185-9.
24. Zhang G, Yang B, Abdul-Karim FW. P16 immunohistochemistry is useful in confirming high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women with negative HPV testing. *Int J Gynecol Pathol.* 2015 Mar; 34(2):180-6.
25. Mills AM, Paquette C, Castle PE, Stoler MH. Risk stratification by p16 immunostaining of CIN 1 biopsies: a retrospective study of patients from de quadrivalent HPV vaccine trials. *Am J Surg Pathol.* 2015 May; 39(5):611-7.

Figures

Figure 1- Consort Diagram (Annexes)

Figure 2- The overexpression of p16INK4a in uterine cervix with HSIL:-A: mild focal positivity, -B: multifocal intense positivity,-C: diffuse positivity. (Annexes)

Tables

Compromised Margins	Caseno recurrence (n=237)	Case recurrence (n=25)	Recurrence rate/ Relative Risk (RR)
Both free	216	15	6.5% (15/237) RR=0.9
Ectocervical	11	4	27% (4/15) RR=4.3
Endocervical	10	5	33% (5/15) RR=5.5
Both compromised	0	1	100% (1/1) RR=16
	237	25	

12% compromised margins / 9.5% recurrence rate/ p value = 0.000

Table 1- Correlation between compromising margins and the prognosis of HSIL treated by LEEP/
Recurrence rates / Relative risk (RR).

Table 2 – Correlation of the data with recurrence rate of HSIL treated by LEEP: A: Global data (262 cases);
B: Margins free LEEP data (231 cases); C: p16INK4a (TMA) data (192 cases). (Annexes)

	IMUNORREACTIVITY	CIN 2	CIN 3	NO RECURRENCE	RECURRENCE
QUALITATIVE ANALYSIS	Negative	14% (14/102)	08% (7/90)	12% (20/172)	05% (1/20)
	Positive	86% (88/102)	92% (83/90)	88% (152/172)	95% (19/20)
	SIGNIFICANCE	P= 0.18		P=0.70	
QUANTITATIVE ANALYSIS	Negative	14% (14/102)	08% (7/90)	12% (20/172)	05% (1/20)
	Mild focal pos	15% (15/102)	05% (5/90)	11% (19/172)	05% (1/20)
	Multifocal intense pos	42% (43/102)	31% (28/90)	36% (63/172)	40% (8/20)
	Diffuse pos	29% (30/102)	56% (50/90)	41% (70/172)	50% (10/20)
	SIGNIFICANCE	P= 0.02		P= 0.62	
PPV		48%		11%	
NPV		66%		95%	
SENSIBILITY		92%		95%	
SPECIFICITY		13%		11%	
ACCURÁCY		89%		93%	

Table 3 - Qualitative and quantitative analysis of immunohistochemistry for p16 with tests able to predict differences in CIN 2 and CIN 3 and the risk of recurrence.

P16INK4a		Negative	Positive	pvalue
LEEP margins	Free	10% (17/165)	90% (148/168)	0.50
	Compromised	15% (4/27)	85% (23/27)	
HIV seropositivity	Negative	13% (21/168)	87% (147/168)	0.60
	Positive	00% (0/9)	100% (9/9)	
Número DNA-HPV by sample	One type	12% (14/121)	88% (107/121)	0.80
	More than 1 type	09% (6/64)	91% (58/64)	
Positivity DNA-HPV 16	Negative	13% (9/71)	87% (62/71)	0.63
	Positive	10% (12/121)	90% (109/121)	

Table 4 – Correlation of overexpression p6INK4a to epidemiological data.

Prognostic factor	Recurrence rate	Relative Risk (RR)
* <u>All factors negative</u>	12%	0.24
P16 (ink4a) positive	11%	2.29
Dna-hpv 16 positive	14%	3.5
Hiv positive	50%	4.1
Compromised margin	37%	6.1
* <u>All factors positive</u>	50%	4.1

Table 5 – Risk score to evaluate the probability of recurrence on HSIL treated by conization.